



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

CERTIFIED COPY OF
COPIE OFFICIELLE PRIORITY DOCUMENT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 AOUT 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

UMENT DE PRIORITÉ

SENTÉ OU TRANSMIS
NFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE
6 bis, rue de Saint Pétersbourg
5800 Paris Cedex 08
téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle, livre VI

cerfa
N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 010801

REMISE DES PIÈCES		Réservé à l'INPI	
DATE		26 JUIL 2002	
LIEU		75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT		0209524	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI			
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		26 JUIL. 2002	
Vos références pour ce dossier (facultatif)			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2. NATURE DE LA DEMANDE <input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> <input type="checkbox"/> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>			
		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez l'une des 4 cases suivantes	
		<input checked="" type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) NOUVELLE METHODE D'ANALYSE D'ACIDE NUCLEIQUE ET SON UTILISATION POUR EVALUER LE DEGRE D'EDITION DE L'ARNm DU RECEPTEUR 5-HT2c.			
4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		<input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège		BIOCORTECH SOCIETE ANONYME PAR ACTIONS SIMPLIFIEES 439755695 Rue 3 rue Pailler 75005 PARIS Code postal et ville Pays FRANCE Française	
Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		N° de télécopie (facultatif) <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{me} page

1er DEPUIS
BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU **26 JUIL 2002**

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0209524

DB 540 17 / 010801

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier :
(facultatif)

239992 D20534 MIP

6 MANDATAIRE (si nécessaire)

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

N ° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Rue

20, rue de Chazelles

Adresse

Code postal et ville

75847 PARIS CEDEX 17

Pays

01 44 29 35 00

N ° de téléphone (facultatif)

01 44 29 35 99

N ° de télécopie (facultatif)

info@regimbeau.fr

Adresse électronique (facultatif)

7 INVENTEUR (s)

Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques

Oui

Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

8 RAPPORT DE RECHERCHE

Paiement échelonné de la redevance
(en deux versements)

Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt

Oui

Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG

Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite »,
indiquez le nombre de pages jointes

VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

L. MARIELLO

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)

Michel Mariello
92122

La présente invention se rapporte à une méthode d'analyse des acides nucléiques mettant en œuvre un jeu de sondes de petite taille incluant des désoxyinosines (dI) à la place de désoxyguanosines (dG). L'invention comprend également de tels jeux de sondes ainsi que leur utilisation dans des procédés de 5 détection et/ou de quantification d'oligonucléotides cibles présents dans des molécules d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou d'ARN (acide ribonucléique) dans un échantillon, notamment la détermination du taux d'édition de l'ARN messager (ARNm) 10 du récepteur 5-HT_{2c} (5-HT_{2c}-R) de la sérotonine. L'invention est aussi relative à une biopuce ou à un réacteur en milieu liquide comprenant de tels jeux de sondes ainsi 15 leurs utilisations, notamment pour la détection et/ou l'identification de polymorphismes génétiques ou pour la détermination du taux d'édition d'un ARNm, que ce soit celui de l'ARNm du 5-HT_{2c}-R ou de tout autre ARN susceptible d'être édité. La présente invention a également pour objet une méthode de sélection de composés capables de moduler le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2c}-R, ainsi que l'utilisation de tels 20 composés pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de l'humeur.

Parmi les méthodes d'analyse des acides nucléiques qui permettent de révéler une différence d'un ou de quelques nucléotides dans une séquence donnée, on peut distinguer deux grandes catégories de méthodes, celles qui sont spécifiques d'une 25 seule séquence et celles qui permettent de détecter simultanément, par hybridation sous forme de duplex d'ADN double brin ou sous forme d'hétéroduplex ADN/ARN, plusieurs séquences différentes (jusqu'à plusieurs milliers).

Dans la première catégorie, on peut ranger - sans être limitatif tant les variantes sont nombreuses et sans les décrire car elles ont toutes été largement 30 utilisées à des degrés divers - le séquençage de l'ADN, séquençage direct ou après amplification itérative par PCR ("polymerase chain reaction"), précédée ou non d'une réaction de transcription inverse (RT-PCR pour "reverse transcription" suivie de PCR) ; la mise en évidence d'un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP pour "restriction fragment length polymorphism") à la suite d'une ou plusieurs mutations ponctuelles qui affectent un ou plusieurs sites de restriction et sa variante, l'AFLP ("amplification length polymorphism") ; la réaction de ligature itérative (LCR pour "ligase chain reaction") et sa variante, la réaction de détection par ligature (LDR pour "ligase detection reaction") ; l'amplification spécifique par PCR d'un allèle muté (PCR-MASA pour "PCR-mutant allele specific amplification") ; l'extension d'amorce

("primer extension") ; Pour toutes ces méthodes et celles qui en dérivent voir "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons ed., 4 vol. mis à jour par trimestre, ISBN 0-471-50338-X.

Dans la seconde catégorie, on trouve les méthodes d'analyse par hybridation en milieu liquide et celles dérivées de la méthode de Southern (ou "Southern blot") qui fut décrite initialement pour l'ADN (Southern, J. Mol. Biol. 1975, 98, 503-517). Parmi ces dernières, on peut citer sans être limitatif, la méthode de Southern appliquée à l'ARN (ou "northern blot", voir Alwine et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 5350-5354, et Alwine et al. Methods Enzymol. 1979, 68, 220-242) ; les hybridations sur support, macro- et micro-hybridations, d'acides nucléiques en collection ("macroarray" et "microarray", voir Fotin et al. Nucleic Acids Res. 1998, 26(6) 1515-1521 et les articles qui y sont référencés, voir aussi Diehl et al. Nucleic Acids Res. 2001, 29(7)e38 et les articles qui y sont référencés). Ces hybridations entre molécules d'acides nucléiques qui aboutissent à la formation d'un ADN double brin ou d'un hétéroduplex de type ADN/ARN sont obtenues soit dans un réacteur en milieu liquide soit, plus généralement, sur un support qui peut être une membrane hydrophobe (nitrocellulose ou Nylon® par exemple) ou une lame de verre activé pour permettre la fixation des sondes d'ADN simple brin ou double brin (qui, dans ce dernier cas, sera ensuite dénaturé pour permettre l'hybridation). Les séquences d'ADN déposées qui servent de sondes pour l'hybridation de molécules d'ADN ou d'ARN qui leur sont complémentaires, peuvent être longues et ce sont alors des séquences d'ADN génomique, généralement amplifiées par PCR ou, plus souvent, d'ADNc (ADN complémentaire) d'ARNm ; dans ce dernier cas, elles proviennent de banques d'ADNc d'origines diverses et se présentent sous forme d'ADN double brin. Les séquences d'ADN peuvent également être sous forme d'ADN simple brin ; dans ce dernier cas, il s'agira, le plus souvent, d'oligodésoxyribonucléotides longs (60 à 80 bases) ou courts (environ 20 bases ou moins). Plus les oligodésoxyribonucléotides sont courts, plus ils permettent de discriminer des séquences qui diffèrent ne fut-ce que d'un seul nucléotide. Cependant, cette discrimination n'est possible que si la température de fusion T_m (T_m pour "melting temperature") des séquences à hybrider est très voisine ou identique.

En effet, s'il est possible par les méthodes de la seconde catégorie de mettre en évidence une différence de séquence portant sur un seul nucléotide, il est nécessaire pour cela que les conditions d'hybridation (concentration en sels et température essentiellement) soient suffisamment strictes pour qu'un seul

mésappariement de base empêche l'hybridation entre la sonde et l'acide nucléique cible. Lorsque ces conditions sont réunies, seule la sonde de séquence exactement complémentaire s'hybride à l'acide nucléique cible qui peut être de l'ADN ou de l'ARN simple brin de séquence recherchée. Pour cela, la sonde doit être de séquence suffisamment longue pour permettre une hybridation à la fois stable et spécifique mais, aussi, suffisamment courte pour autoriser une discrimination entre des populations d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui présenteraient entre elles une différence de séquence d'un seul nucléotide.

Toutes choses étant égales par ailleurs, la température à laquelle est obtenue l'hybridation spécifique dépend essentiellement de la composition en bases des séquences à appariер, adénine, thymine (ou uracile), guanine et cytosine présentes sous forme de désoxyribonucléoside monophosphate dans l'ADN et de ribonucléoside monophosphate dans l'ARN (l'uracile remplaçant alors la thymine), reliés entre eux par des liaisons 3'-5'-phosphodiesters. On utilisera les abréviations dA, dT, dG et dC pour désoxyadénosine, désoxythymidine, désoxyguanosine et désoxycytidine monophosphates, respectivement, et A, U, G et C pour adénosine, uridine, guanosine et cytidine monophosphates, respectivement. Plus ces séquences sont riches en guanines et cytosines, plus la température qui permet d'obtenir une hybridation spécifique est élevée, en raison de la formation de trois liaisons hydrogènes entre ces deux bases appariées, contre deux seulement entre les adénines et thymines (ou uraciles) appariées. Cependant, la position relative de ces bases à l'intérieur des séquences appariées joue aussi un rôle dans la stabilité de la double hélice d'ADN ou de l'hétéroduplex ADN/ARN, en raison des interactions hydrophobes que contractent entre eux certains atomes de carbone des plateaux des bases puriques et pyrimidiques empilées. Par conséquent, du pourcentage en adénines et thymines (ou uraciles), ainsi qu'en guanines et cytosines respectivement appariées mais, aussi, de la position relative de ces bases appariées dans une séquence donnée, dépend la température qui permet d'obtenir une hybridation spécifique donc une discrimination entre deux séquences qui ne diffèrent, entre elles, que d'une seule base.

La température qui permet une hybridation spécifique peut être calculée de façon approximative selon plusieurs formules qui tiennent compte de la longueur des séquences à apparier, ainsi que de leur composition en bases (voir en particulier Wallace et al. Nucleic Acids Res. 1979, 6(11), 3543-3557 pour le calcul de la Tm selon la règle de Wallace, ainsi que Breslauer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83(11), 3746-3750 pour le calcul de la Tm par la méthode du plus proche voisin).

Cependant, aucune méthode de calcul ne permet de déterminer de façon précise la Tm d'un ADN double brin qui contient des dI puisque, dans toutes les formules actuellement proposées, l'énergie d'appariement entre dI, d'une part et dA, dG, ou dT, d'autre part, est considérée comme identique, ce qui est inexact (voir ci-dessous).

5 Cette température peut également être déterminée expérimentalement par mesure de l'effet hyperchrome de l'ADN en fonction de la température. Pour cela la densité optique de l'ADN double brin est mesurée à 260 nm, en continu, en fonction de la température. Entièrement sous forme simple brin, l'ADN absorbe à 260 nm environ 1,4 fois plus que sous forme double brin. La température à laquelle l'ADN est, pour moitié, 10 sous forme double brin et, pour moitié, sous forme simple brin est la température de fusion ou Tm. La Tm est mesurée au point d'inflexion de la courbe de dénaturation thermique de l'ADN qui représente la valeur de la densité optique mesurée à 260 nm en fonction de la température. Cette Tm est d'autant plus élevée que le nombre de guanines et cytosines appariées est important, dans une séquence donnée. Elle 15 caractérise donc une séquence d'ADN double brin de longueur donnée selon sa composition en bases.

20 Déterminer la température optimale d'hybridation pour assurer une discrimination entre deux séquences qui ne diffèrent que d'un seul nucléotide et, à plus forte raison, de plusieurs nucléotides, est aisé, à condition que les séquences à appairer soient relativement courtes.

25 Cependant, une hybridation spécifique entre plusieurs sondes et autant de molécules d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui ne diffèrent entre elles que d'un seul nucléotide ou qui présentent des séquences complètement différentes, avec des pourcentages différents en adénines et thymines (ou uraciles), ainsi qu'en guanines et cytosines respectivement appariées, requiert autant de conditions d'hybridation qu'il y a de séquences à hybrider. En effet, les conditions qui autorisent une hybridation spécifique dépendant de la composition en bases des séquences à hybrider, les températures nécessaires à l'obtention d'hybridations spécifiques seront d'autant plus élevées qu'augmentera le nombre de guanines et cytosines appariées en 30 remplacement d'autant d'adénines et thymines (ou uraciles) appariées.

35 Par conséquent, il n'est pas possible d'obtenir, simultanément sur le même support solide, des hybridations spécifiques avec des séquences imposées de petite taille car les températures qui garantissent la spécificité d'hybridation devraient être différentes pour chaque séquence à hybrider, ce que confirme la détermination de leur Tm.

Cette impossibilité reste également vraie lorsque l'on désire effectuer ces hybridations spécifiques avec des séquences imposées de petite taille en milieu liquide dans un même réacteur, ou encore dans un ensemble de réacteurs auxquels on désire appliquer les mêmes conditions d'hybridations spécifiques, en particulier de 5 température, comme par exemple un ensemble de cupules disposées sur une même plaque ou une même microplaquette.

Ainsi, il reste souhaitable de pouvoir disposer aujourd'hui d'une méthode d'analyse permettant de réaliser des hybridations spécifiques entre acides nucléiques de séquences imposées de petite taille, séquences ne différant entre elles que d'un 10 seul nucléotide ou séquences complètement différentes, autorisant des hybridations qui aboutissent à la formation de duplex présentant des pourcentages différents en adénines et thymines (ou uraciles), ainsi qu'en guanines et cytosines respectivement appariées, ceci simultanément sur un même support solide, ou encore en phase liquide dans un même réacteur ou dans un ensemble de réacteurs auxquels on désire 15 appliquer les mêmes conditions d'hybridation spécifique, en particulier de température.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Le problème, dont la solution est apportée par la présente invention, est de pouvoir définir un ensemble de sondes nucléiques dont on pourra disposer et dont la composition en nucléotides permet d'obtenir des conditions similaires d'hybridation 20 pour cet ensemble de sondes, telles que ces sondes soient susceptibles de s'hybrider de façon spécifique à des acides nucléiques cibles de type ADN et/ou ARN de séquence imposée, quel que soit leur pourcentage relatif en adénines et thymines, ainsi qu'en guanines et cytosines.

Pour homogénéiser la température d'hybridation de toutes les sondes avec des 25 acides nucléiques cibles (ADN ou ARN) de séquence imposée, tout en gardant une spécificité absolue d'hybridation, quel que soit le pourcentage relatif en adénines et thymines, ainsi qu'en guanines et cytosines respectivement appariées, il est proposé ici d'utiliser des sondes courtes qui possèdent des désoxyinosines (dI) au lieu de (dG) 30 ceci non seulement pour assurer un appariement spécifique avec des dC ou des C, mais également pour assurer cet appariement spécifique avec des dC ou des C par l'intermédiaire de deux liaisons hydrogènes, à la place des trois liaisons hydrogènes formées entre dG et dC ou dG et C.

Le nombre et la position des dI qui remplacent les dG dans les séquences des sondes imposées sont déterminés de façon à ce que les séquences des sondes 35 imposées ainsi modifiées présentent entre elles un contenu similaire, de préférence

égal, en guanines et cytosines, l'hybridation de ces sondes modifiées aboutissant ainsi à la formation de duplex ADN/ADN ou d'hétéroduplex ADN/ARN dont les Tm sont suffisamment voisines pour autoriser des conditions d'hybridation spécifique identiques pour chacune de ces sondes.

5 Le nombre et la position des dl qui remplacent les dG seront en particulier déterminés par le nombre et la position à l'intérieur de la séquence d'une sonde donnée, des appariements entre dG et dC ou dG et C, qui remplacent des appariements entre dA et dT ou dA et U d'une autre séquence sonde donnée.

10 Par la solution proposée ici, la dl n'est pas utilisée en tant que nucléotide susceptible de s'apparier aussi bien avec dC qu'avec dA, dG et dT ou, aussi bien avec C qu'avec A, G et U. En effet, si la dl est bien susceptible de s'apparier avec ces désoxyribonucléosides et ribonucléosides, toujours par l'intermédiaire de deux liaisons hydrogènes, l'énergie d'appariement est très différente selon les cas. Par ordre décroissant d'énergie d'appariement, on aura dl:dC > dl:dA > dl:dG = dl:dT et dl:C > dl:A > dl:G = dl:U. De plus, en fonction de l'environnement de dl, l'énergie d'appariement n'est pas strictement identique, selon que cette dl est positionnée avant ou après dA, dG, dC, dT ou une autre dl. Néanmoins, dans tous les cas, dl s'appariera toujours mieux avec dC ou C qu'avec dT ou U, ces deux dernières possibilités d'hybridation étant toujours les moins favorables. Sur les propriétés d'appariement de dl avec les autres désoxyribonucléotides, on pourra mais sans s'y limiter, se référer aux articles de Case-Green et al., (Nucleic Acids Res. 1994, 22(2), 131-136) et de Martin et al. (Nucleic Acids Res. 1995, 13(24), 8927-8938) et aux documents qui y sont référencés.

15 Ainsi, sous un premier aspect, la présente invention a pour objet une méthode d'analyse d'un échantillon contenant un polynucléotide cible (à l'intérieur d'une molécule d'ADN ou d'ARN) et/ou l'un de ses variants, ledit variant comprenant une ou plusieurs substitutions de base par rapport audit polynucléotide cible, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

20 a) la mise à disposition de l'échantillon contenant ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, et d'au moins deux oligodésoxyribonucléotides différents, ci-après désignés par le terme général de "sondes", ces dernières étant disposées soit de manière distincte sur un support solide, soit contenues dans un même réacteur, soit encore réparties de manière distincte sur un dispositif comprenant un ensemble de réacteurs, chacune desdites sondes présentant une séquence susceptible de former un duplex spécifique avec le polynucléotide cible ou l'un de ses variants attendus ;

5 b) l'incubation dudit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, avec lesdites sondes dans des conditions d'hybridation spécifique, permettant d'obtenir la formation d'un duplex entre ledit polynucléotide cible ou l'un de ses variants attendus, et une desdites sondes, même si ledit polynucléotide cible et l'un de ses variants attendus ne diffèrent entre eux que d'un seul nucléotide ; et

10 10 c) la détection des duplex formés sur ledit support solide, ou encore formés en solution dans ledit même réacteur ou formés en solution dans chacun des réacteurs dudit ensemble de réacteurs, caractérisée en ce qu'au moins un des nucléotides dG dans au moins une desdites sondes, a été substitué par un nucléotide dI, de telle façon que les conditions 15 d'hybridation spécifique permettant d'obtenir la formation d'un duplex entre ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, et une desdites sondes à l'étape b) sont identiques pour chacune desdites sondes.

15 De préférence, l'invention concerne une méthode d'analyse selon la présente invention, caractérisée en ce que à l'étape a) lesdites au moins deux sondes différentes sont disposées de manière distincte sur un support solide, soit contenues en solution dans un même réacteur, soit encore réparties en solution de manière distincte sur un dispositif comprenant un ensemble de mêmes réacteurs, et en ce qu'à 20 l'étape c), respectivement, les duplex formés sont détectés sur le support solide, les duplex formés en solution sont détectés dans ledit même réacteur (ou partir d'une aliquote contenue dans ce même réacteur) ou dans chacun des réacteurs dudit ensemble de même réacteurs.

25 Par ensemble de réacteurs, on entend désigner dans la présente description, un ensemble de réacteurs, de préférence de mêmes réacteurs, de préférence encore regroupés dans un ou, suivant le nombre de réacteurs, dans plusieurs mêmes dispositifs, et où les mêmes conditions d'hybridation seront appliqués pour chacun des réacteurs de cet ensemble.

30 Dans un mode de réalisation préféré, lorsque le nombre de réacteurs est supérieur à un, le nombre de réacteurs est égal au nombre desdites sondes différentes.

35 De préférence encore, cet ensemble de réacteurs pourra se présenter, suivant la taille et/ou le nombre des réacteurs, sous la forme d'une ou plusieurs mêmes plaques ou microplaques sur lesquelles seront disposées des conteneurs, cupules ou puits dans lesquels l'incubation dudit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, avec lesdites sondes sera effectuée en milieu liquide.

Sous ce premier aspect, la présente invention a pour objet particulier une méthode d'analyse d'un échantillon contenant un polynucléotide cible et/ou l'un de ses variants, ledit variant comprenant une ou plusieurs substitutions de base par rapport audit polynucléotide cible, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) la mise à disposition de l'échantillon contenant ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, et d'au moins deux oligodésoxyribonucléotides différents, ci-après désignés par le terme général de "sondes", ces dernières étant disposées de manière distincte sur un support solide, chacune desdites sondes présentant une séquence susceptible de former un duplex spécifique avec le polynucléotide cible ou l'un de ses variants attendus ;
- 10 b) l'incubation dudit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, avec lesdites sondes dans des conditions d'hybridation spécifique, permettant d'obtenir la formation d'un duplex entre ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, et une desdites sondes, même si ledit polynucléotide cible et l'un de ses variants attendus ne diffèrent entre eux que d'un seul nucléotide ; et
- 15 c) la détection des duplex formés sur le support solide, caractérisée en ce qu'au moins un des nucléotides dG dans au moins une desdites sondes, a été substitué par un nucléotide dI, de telle façon que les conditions d'hybridation spécifique permettant d'obtenir la formation d'un duplex entre ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, et une desdites sondes à l'étape 20 b) sont identiques pour chacune desdites sondes.

Par acide nucléique, sonde nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, séquence polynucléotidique et, en absence d'autre précision, on entend désigner ici un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides autres que dA, dT, dG, dC ou A, U, G et C, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin ou un ADN simple brin qu'à des produits de transcription desdits ADN tels que des ARN.

30 Par sonde, on entendra désigner ici un oligodésoxyribonucléotide utilisé en tant que sonde.

35 Par sondes de petite taille, on entendra désigner ici des sondes dont la taille est suffisamment courte pour permettre l'hybridation spécifique et la discrimination entre deux polynucléotides cibles différents, même si cette différence ne porte que sur une base. De préférence, ces sondes présenteront une longueur inférieure à 40

nucléotides et, de façon encore plus préférée, inférieure à 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21 nucléotides. De préférence encore, lesdites sondes comprendront, au moins, 10 nucléotides et, de façon encore plus préférée, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 nucléotides.

5 Par oligonucléotide cible on entendra désigner ici un oligonucléotide que l'on cherche à détecter et/ou identifier et/ou quantifier dans un échantillon, ceci par opposition au terme de sonde, oligonucléotide cible généralement dérivé d'une partie intégrante d'un ADN ou d'un ARN extrait d'un prélèvement biologique, de tissu, de cellules ou de microorganismes tels que des bactéries, levures, champignons, algues 10 ou encore de virus ou phages.

Par oligonucléotide cible dérivé d'un ADN ou d'un ARN, on entendra désigner ici un oligonucléotide (ADN simple brin ou ARN simple brin) dont la séquence est identique ou complémentaire à 100 % de la séquence dudit ADN, ou dudit ARN, ou de la séquence d'un de leurs fragments.

15 Par variant ou variant attendu d'un oligonucléotide cible, on entendra désigner ici un oligonucléotide dont la séquence comporte une ou plusieurs substitutions de base par rapport audit oligonucléotide cible, variant dont on cherche à détecter et/ou identifier et/ou quantifier la présence dans un échantillon.

Par duplex, on entend désigner dans la présente description un acide nucléique 20 double brin résultant de l'hybridation spécifique entre deux brins d'ADN complémentaires, strictement ou non (homoduplex ADN/ADN) ou entre un brin d'ADN et un brin d'ARN qui lui est complémentaire, strictement ou non (hétéroduplex ADN/ARN). Dans la présente description, seuls les nucléotides dC ou C seront considérés comme étant complémentaires de dI.

25 Par édition de l'ARN ("RNA editing") ou, plus simplement, par édition, on entend désigner dans la présente description, la désamination des adénosines (A) en inosines (I), à l'intérieur d'une séquence d'ARN, par des adénosines désaminases dont l'activité dépend de l'ARN double brin ; ces adénosines désaminases sont des ADAR ("adenosine deaminase RNA-dependent") selon que l'ARN cible est un ARNm, ou bien 30 des ADAT ("adenosine deaminase tRNA-dependent") selon que les ARN cibles sont des ARNt (pour revue, voir Maas et al. BioEssays, 2000, 22(9), 790-802, ainsi que Reenan, TRENDS in Genetics, 2001, 17(2), 53-56, ainsi que Gerber et al. TRENDS in Biochemical Sciences, 2001, 26(6), 376-384, ainsi que Baas, Ann. Rev. Biochem. 2002, 71, 817-846, avec les articles qui y sont référencés).

Par ARN édité, on entend désigner dans la présente description, toute séquence d'ARN dont, au moins, une adénosine a été désaminée en inosine par une adénosine désaminase.

Dans un mode de réalisation préféré, le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que les températures de fusion (Tm) des duplex pouvant être formés entre une desdites sondes et ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, sont identiques ou suffisamment proches pour permettre l'obtention desdits duplex par hybridation spécifique dans les mêmes conditions d'hybridation pour chacune desdites sondes. De préférence, les écarts maximum des Tm entre lesdits duplex seront, au maximum, de 10°C et, de façon encore plus préférée, de 9, 8, 7, 6, 5°C ou moins.

Les méthodes permettant de mesurer les Tm d'ADN double brin sont anciennes et bien connues de l'homme de l'art. Elles ne seront pas développées ici mais on peut citer pour mémoire Lehman et al. (J. Chem. Phys. 1968, 4(7), 3170-3179), Crothers (Biopolymers, 1968, 6(10), 1391-1404) et, pour revue, Lazurlin et al. (Biopolymers, 1970, 9(11), 1253-1306).

Dans un mode de réalisation également préféré, le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que le nombre de dG restants susceptibles de s'apparier à dC ou à C dans lesdits duplex est, de préférence, identique ou peu différent pour chacune desdites sondes. De préférence encore, la différence entre le nombre de dG restants susceptibles de s'apparier à dC ou à C dans lesdits duplex, est inférieure à 10% de la longueur total dudit duplex.

Dans un mode de réalisation également préféré, ledit polynucléotide cible ou l'un de ses variants attendus est de type ADN simple brin ou ARN simple brin.

Dans un mode de réalisation également préféré, lesdites sondes comprennent un petit nombre de bases, de préférence 30 bases ou moins de 30 bases, de manière préférée 25 bases ou moins de 25 bases, de manière encore plus préférée 20 bases ou moins de 20 bases.

Dans un mode de réalisation également préféré, lesdites sondes et lesdits polynucléotides cibles, ou l'un de leurs variants attendus, mettent en jeu un nombre identique de bases ou un nombre de bases différent d'une unité ou, au plus, de 10 %.

Dans un mode de réalisation également préféré, ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, est préalablement marqué par un marqueur capable

d'engendrer, directement ou indirectement un signal détectable, de préférence détectable par fluorescence ou par mesure de radioactivité lorsque lesdites sondes sont disposées sur un support solide.

Par exemple, lesdits marqueurs lorsqu'ils sont fluorescents peuvent être choisis 5 parmi des fluorochromes, notamment dérivés de la cyanine, tels que les fluorochromes Cy5 ou Cy3.

Dans un mode de réalisation également préféré, l'appariement spécifique de la sonde avec ledit polynucléotide cible est mis en évidence grâce à l'utilisation d'un composé susceptible d'être détecté par transfert d'énergie moléculaire, notamment par 10 transfert d'énergie de fluorescence (dénommé « FRET » pour "fluorescence resonance energy transfer").

Par la technique « FRET », l'appariement spécifique de la sonde avec ledit polynucléotide cible ou l'un de ses variants pourra, par exemple, être révélé par un couple de fluorophores, le premier fluorophore étant soit accepteur soit donneur de 15 photons et situé en 5' ou en 3' de la sonde, le second fluorophore étant alors respectivement soit donneur soit accepteur de photons, et positionné respectivement en 3' ou en 5' d'une seconde sonde ; cette seconde sonde est définie telle qu'elle puisse s'hybrider de façon strictement identique à une séquence identique et 20 adjacente auxdits polynucléotides cibles, et telle que le second fluorophore, donneur ou accepteur de photon, soit positionné à distance suffisamment proche du premier fluorophore, pour assurer le transfert d'énergie du fluorophore donneur au fluorophore accepteur.

Dans les méthodes d'analyse ou procédés de l'invention, les marqueurs et les 25 techniques permettant de détecter et/ou de quantifier la présence de duplex formés sur un support solide revêtu de sondes, ou formés en phase homogène liquide sont bien connus de l'homme de l'art et ne seront pas développés ici.

Pour les systèmes de marqueurs permettant la détection d'une hybridation entre deux polynucléotides en phase liquide homogène par transfert d'énergie moléculaire, notamment par « FRET », on pourra par exemple, mais sans s'y limiter, 30 se référer à l'article de Livak et al. (PCR Methods Appl. 1995, 4, 357-362) et au document brevet US 6,117,637 et aux documents qui y sont référencés.

Dans un mode de réalisation encore préféré, ledit support solide est un support solide pouvant être, le cas échéant, activé ou fonctionnalisé pour assurer une fixation covalente desdites sondes, notamment choisis parmi les supports solides en verre, en

plastique, en Nylon®, en silicone, en silicium, ou encore en polyoses ou poly(hétérooses), tel que la cellulose, de préférence en verre, ce dernier pouvant être silanisé.

Dans un mode de réalisation également préféré, lesdites sondes pourront être fonctionnalisées à l'aide d'une fonction capable de réagir avec ledit support solide pour former une liaison covalente avec ledit support, ce dernier pouvant être activé, fonctionnalisé ou encore muni d'un agent espaceur.

Dans un mode de réalisation également préféré, ledit échantillon à analyser contient ledit polynucléotide cible et l'un au moins de ses variants attendus.

Dans un mode de réalisation également préféré, le nombre desdites sondes différentes est au moins égal à 3, 4, 5, 6 7, 8, 9, 10, 15, 20 et 25 ou encore au moins égal au nombre de variants attendus dudit polynucléotide cible dont l'un au moins est susceptible d'être présent dans ledit échantillon à analyser, ledit nombre de variants étant au moins égal à 2.

Dans un mode de réalisation également préféré, le nombre desdites sondes dont au moins un des nucléotides dG a été substitué par un nucléotide dI est au moins égal à 2, de préférence à 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ou encore au nombre de variants attendus dudit polynucléotide cible comportant un nucléotide dC ou C à la place d'un autre nucléotide présent dans ledit polynucléotide cible.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un jeu d'au moins deux sondes oligodésoxyribonucléotidiques différentes, caractérisé en ce qu'au moins un des nucléotides dG sur au moins une desdites sondes a été substitué par un nucléotide dI, de telle façon que les conditions d'hybridation sont identiques pour chacune desdites sondes, ces dernières contenant une séquence susceptible de former un duplex spécifique avec un polynucléotide cible, ou l'un de ses variants.

De préférence, le jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention est caractérisé en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que les Tm des duplex pouvant être formés avec chacune desdites sondes sont identiques ou suffisamment proches pour permettre l'obtention desdits duplex par hybridation spécifique dans les mêmes conditions d'hybridation pour chacune desdites sondes.

De préférence encore, le jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention est caractérisé en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que le nombre de dG restants susceptibles de s'apparier à dC ou à C dans lesdits duplex est identique ou peu différent pour chacune desdites sondes.

De préférence encore, le jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites sondes sont de type ADN monocaténaire.

De préférence encore, le jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites sondes comprennent un petit nombre de 5 bases, de préférence 30 bases ou moins de 30 bases, de manière préférée 25 bases ou moins de 25 bases, de manière encore plus préférée 20 bases ou moins de 20 bases.

De préférence encore, le jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention est caractérisé en ce que lesdites sondes mettent en jeu un nombre 10 identique de bases ou différant d'une unité ou, au plus, de 10 %.

Dans un mode de réalisation également préféré, le nombre desdites sondes différentes est au moins égal à 3, 5, 7, 10, 15, 20 et 25 ou encore au moins égal au 15 nombre de variants attendus dudit polynucléotide cible dont l'un au moins est susceptible d'être présent dans ledit échantillon à analyser, ledit nombre de variants étant au moins égal à 2.

De préférence encore, le jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention est caractérisé en ce que le nombre desdites sondes dont au moins un des nucléotides dG a été substitué par un nucléotide dI est au moins égal à 2, de préférence à 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ou encore au nombre de variants attendus dudit 20 polynucléotide cible comportant un nucléotide dC ou C à la place d'un autre nucléotide présent dans ledit polynucléotide cible.

Sous un aspect particulièrement préféré, la présente invention a pour objet un 25 jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué ou comprend un ensemble de sondes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon, la présence d'un oligonucléotide cible et un ensemble de ses variants attendus.

De préférence, ledit oligonucléotide cible est dérivé d'un fragment de gène susceptible de comporter - ou dont le produit de transcription est susceptible de comporter - au moins une substitution de base dans la séquence dont dérive ledit 30 oligonucléotide cible.

De préférence encore, ledit oligonucléotide cible est dérivé d'un fragment d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition dans la séquence de ce fragment.

De manière encore plus préférée, ledit oligonucléotide cible est dérivé d'un 35 fragment d'ARNm d'un récepteur membranaire de cellule eucaryote, notamment de

mammifère, incluant le récepteur de la sérotonine 5-HT_{2C} (5-HT_{2C}-R) ou la sous-unité B du récepteur du glutamate (GluR-B), le 5-HT_{2C}-R étant le plus préféré.

Dans un mode de réalisation également préféré, la présente invention a pour objet un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué d'un ou comprend un ensemble de sondes distinctes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon, la présence potentielle de tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm, édité et non édité.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, la présente invention a pour objet un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué d'un ou comprend au moins un ensemble de sondes distinctes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon, la présence potentielle du polynucléotide cible dérivé du fragment d'ARNm non édité et de tout polynucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm dont l'édition peut entraîner une modification de la séquence d'acides aminés de la protéine qui est le produit de traduction de l'ARNm non édité.

Dans un mode de réalisation encore plus préféré, la présente invention a pour objet un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué d'un ou comprend un ensemble de trente-deux sondes distinctes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm, édité ou non édité, du 5-HT_{2C}-R.

Dans ce cas particulier, on entend désigner par "tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm édité ou non édité" :

- n'importe lequel des oligonucléotides de l'ensemble des oligonucléotides constitué par les trente-deux ARN antisens, c'est-à-dire complémentaires à 100 % du fragment de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 et dans laquelle SEQ ID No. 33, chaque nucléotide A correspondant à un site d'édition (nucléotides en position 1,3, 7, 8, ou 13 de la SEQ ID No. 33) peut être édité ou non ; ou

- n'importe lequel des oligonucléotides de l'ensemble des oligonucléotides constitué par les trente-deux ADN, c'est-à-dire complémentaires à 100 % du fragment de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 et

dans laquelle SEQ ID No. 33, chaque nucléotides A correspondant à un site d'édition (nucléotides en position 1,3, 7, 8, ou 13 de SEQ ID No. 33) peut être édité ou non.

Dans un mode de réalisation encore plus préféré, la présente invention a pour objet un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'invention, caractérisé en ce 5 que ledit jeu est constitué ou comprend les ensembles de sondes suivants :

- l'ensemble des trente-deux sondes de séquence comprenant les séquences des fragments du nucléotide 3 au nucléotide 15 des SEQ ID Nos. 1 à 32, les parties de ces sondes situées en dehors dudit fragment du nucléotide 3 au nucléotide 15 étant identiques aux parties correspondantes (en ADN) de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R ; ou

10 - l'ensemble des trente-deux sondes de séquence SEQ ID Nos. 1 à 32.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet une biopuce comprenant un jeu d'au moins deux sondes différentes selon la présente invention, déposées sur un même support solide, ledit support solide pouvant être, le cas échéant, activé ou fonctionnalisé pour assurer une fixation covalente desdites sondes, 15 et notamment choisi parmi les supports solides tels que décrits ci-avant.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un réacteur comprenant en solution un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'a présente invention.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un dispositif, 20 notamment une plaque ou une microplaques, constitué d'au moins deux conteneurs ou cupules, ledit dispositif comprenant un jeu d'au moins deux sondes différentes selon la présente invention, chacun des conteneurs ou cupules contenant une desdites sondes.

De préférence, la présente invention concerne une biopuce dans laquelle 25 lesdites sondes sont fixées sur ledit support solide, notamment par liaison covalente.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet une trousse de réactifs pour la détection, l'analyse qualitative ou quantitative d'acides nucléiques cibles dans un échantillon, caractérisé en ce qu'elle comprend un jeu d'au moins deux sondes différentes selon la présente invention et/ou une biopuce selon l'invention.

Sous encore un autre aspect, la présente invention a pour objet un procédé 30 pour la détection et/ou la quantification d'oligonucléotides cibles dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence sur une biopuce selon l'invention, ou encore dans 35 chacun des conteneurs ou cupules du dispositif selon l'invention, dans les conditions

permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes ;

5 b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

10 c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par chacune desdites sondes par hybridation spécifique.

15 La présente invention comprend également un procédé pour la détection et/ou la quantification d'oligonucléotides cibles dans un échantillon, ledit oligonucléotide cible étant dérivé d'un fragment d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition dans la séquence du fragment dont dérive ledit oligonucléotide cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence sur une biopuce revêtue d'un jeu de sondes selon l'invention, ou encore dans chacun des conteneurs ou cupules du dispositif selon l'invention, dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes ;

25 b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

30 c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par chacune desdites sondes par hybridation spécifique.

35 La présente invention comprend également un procédé pour la détection et/ou la quantification de tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition dans la séquence du fragment dont dérive ledit oligonucléotide cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence,

- soit sur une biopuce revêtue d'un jeu de sondes selon l'invention, ou encore

30 - soit dans chacun des conteneurs ou cupules du dispositif selon l'invention, notamment dans chacune des cupules d'une microplaque, constitué d'au moins deux cupules, ladite microplaque comprenant un jeu de sondes selon la présente invention, chacune des cupules contenant une seule desdites sondes,

35 dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes, ledit jeu de sondes étant constitué d'un ou comprenant un

ensemble de sondes distinctes capable de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon la présence potentielle de tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm, édité et non édité ;

5 b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par chacune desdites sondes par hybridation spécifique.

10 La présente invention comprend également un procédé pour la détection et/ou la quantification de tout oligonucléotide cible présent dans un échantillon et dérivé d'un fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm édité ou non édité, du 5-HT_{2C}-R, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence,

- soit sur une biopuce revêtue d'un jeu constitué d'un ou comprenant l'ensemble de trente-deux sondes distinctes selon l'invention, ou encore

20 - soit dans chacun des conteneurs ou cupules du dispositif selon l'invention, ce dispositif comprenant un jeu constitué d'un ou comprenant l'ensemble de trente-deux sondes distinctes selon l'invention, notamment dans chacune des cupules d'une microplaquette comprenant 32 cupules, chacune de ces cupules contenant une seule desdites sondes de l'ensemble de trente-deux sondes,

l'ensemble des trente-deux sondes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, 25 l'édité ou non édité, dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes ;

30 b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par chacune desdites sondes par hybridation spécifique.

Sous encore un autre aspect, la présente invention comprend également un procédé de détermination, dans un échantillon, du pourcentage de chacune des

formes éditées et non éditées de l'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition, par rapport à la quantité totale des formes d'ARNm éditées ou non éditées présentes dans ledit même échantillon (dénommé « taux d'édition »), caractérisé en ce qu'il comprend un procédé selon l'invention pour la détection et/ou la quantification de tout oligonucléotide cible présent dans un échantillon et dérivé d'un fragment de l'ARNm susceptible d'être édité ou non, et dans lequel procédé à la fin de l'étape c) on détermine pour chacune desdites sondes le rapport exprimé en pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes.

10 Dans un mode particulièrement préféré des procédés ci-avant selon l'invention, les oligonucléotides cibles sont des ARNm antisens ou des ADN complémentaires des fragments dudit ARNm édité ou non édité, et lesdites sondes sont des ADN correspondant aux séquences du fragment dudit ARNm édité ou non édité.

15 Dans un mode également préféré des procédés ci-avant selon l'invention, lesdits fragments dont dérivent les oligonucléotides cibles sont des fragments d'acides nucléiques extraits à partir d'un prélèvement biologique d'un organisme eucaryote, notamment le mammifère, dont l'être humain.

20 Dans un mode de réalisation également préféré, les oligonucléotides cibles mis en œuvre dans les procédés selon l'invention sont préalablement marqués par un marqueur capable d'engendrer directement ou indirectement un signal détectable, de préférence fluorescent ou radioactif.

25 Sous encore un autre aspect, la présente invention comprend également l'utilisation d'une biopuce ou d'un dispositif selon l'invention comme matrice d'affinité, pour la purification des acides nucléiques ou pour le séquençage des acides nucléiques.

La présente invention comprend en outre l'utilisation d'une biopuce ou d'un dispositif selon l'invention pour la détection et/ou l'étude de polymorphismes génétiques, notamment de SNP ("Single Nucleotide Polymorphism") ou pour l'analyse qualitative ou quantitative de l'expression de gènes.

30 Par exemple, mais sans s'y limiter, on pourra déposer sur les biopuces ou dans les conteneurs, notamment des cupules des dispositifs selon l'invention, des sondes d'ADN correspondant à un gène d'intérêt connu. Chaque dépôt pourra contenir une sonde correspondant à un gène et, d'un dépôt à l'autre, les sondes correspondront audit gène présentant un polymorphisme.

Les ADN ou ARN génomiques, ou ARNm, ou leurs fragments, du tissu, de la cellule ou des microorganismes que l'on souhaite étudier pourront être extraits puis marqués par exemple avec des fluorochromes ou avec des composés radioactifs (les ADN pourront être amplifiés par PCR et les ARN ou ARNm pourront notamment être transformés en ADN complémentaires (ADNc) par transcription inverse et, le cas échéant, amplifiés par les techniques de RT-PCR, ou encore transformés en ARN antisens).

Ces ADNc ou ARN antisens seront ensuite déposés sur la biopuce revêtue des sondes selon l'invention et, le cas échéant, pourront se lier par hybridation spécifique avec ces sondes préalablement déposées qui leur correspondent. Sera ensuite détectée sur chaque dépôt ou dans chaque conteneur, la quantité de signal, notamment de fluorescence ou de radioactivité, correspondant ainsi à la quantité d'acides nucléiques cibles hybridés, qui sera notamment proportionnelle à la quantité initiale d'ARNm extraits, si les ADN cibles déposés sont des ADNc complémentaires d'ARNm rétro-transcrits. On pourra ainsi mesurer l'activité de transcription de la cellule pour certains gènes.

Les applications de ces biopuces à ADN ou dispositifs selon l'invention sont par conséquent nombreuses, telles que les études de la transcription, le diagnostic (recherche de mutation), la recherche de cibles thérapeutiques, le génotypage.

La présente invention comprend en outre l'utilisation d'une biopuce ou d'un dispositif selon l'invention pour la détermination du taux d'édition d'un ARNm.

Les méthodes d'analyse par des procédés utilisant des biopuces ou des dispositifs selon l'invention dans des trousse de réactif selon l'invention permettent de mettre en évidence une ou plusieurs substitutions de base dans une courte séquence d'ADN. Elles permettent également de révéler les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP). Elles permettent aussi de mesurer le degré d'édition des ARNm, que cette édition soit restreinte à un seul site ou qu'elle affecte plusieurs sites dans la même molécule d'ARNm. Autrement dit, elles permettent de révéler tout mésappariement, de un à plusieurs nucléotides, dans une courte séquence donnée quelle que soit sa composition en bases. Par cette caractéristique, elles permettent donc de poser le diagnostic de mutation ponctuelle, comme elles permettent de détecter la présence d'agents pathogènes - dont elles permettent le génotypage - qui peuvent être des virus, des procaryotes ou des eucaryotes, qui infectent l'homme, les animaux et les plantes. Elles permettent aussi l'analyse du transcriptome avec des sondes courtes, selon une stratégie différente de celles utilisées jusqu'ici, puisqu'elle n'impose pas,

entre les différentes séquences, un pourcentage constant en guanines et cytosines appariées. Elles permettent enfin d'assurer le génotypage d'individus appartenant soit à la même espèce, soit à des espèces différentes, dans le cadre de la génomique comparative.

5 Sous encore un autre aspect, la présente invention comprend également une méthode de sélection d'un composé capable de moduler l'édition d'un site d'édition situé sur un fragment d'un ARNm présent dans une cellule eucaryote, notamment de mammifère, ledit fragment d'ARNm édité ayant la séquence notée « E » et ledit fragment d'ARNm non édité ayant la séquence notée « NE », caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

10 a) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules

eucaryotes exprimant le gène dudit ARNm susceptible d'être édité ;

15 b) la mise en évidence de la modulation ou non de l'édition du site d'édition dudit ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape a) par un procédé selon l'invention pour la détection et/ou la quantification d'oligonucléotides cibles dans un échantillon, ledit oligonucléotide cible étant dérivé d'un fragment d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition sur la séquence du fragment dont dérive ledit oligonucléotide cible, et dans lequel procédé au moins deux desdites sondes sont deux ADN correspondant, pour l'un à la séquence d'ADN dudit fragment « E » et, pour l'autre, à la séquence d'ADN dudit fragment « NE » ;

20 c) le cas échéant, en ce que l'on compare à l'étape c) du procédé ci-avant cité à l'étape b) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés au niveau de chacune desdites sondes à celles obtenues à partir d'une population de cellules témoin ; et

25 d) la sélection de ce composé si celui-ci module l'édition dudit site d'édition.

30 Sous cet autre aspect, la présente invention comprend en outre une méthode de sélection de composés capables de moduler le taux d'édition d'un fragment d'ARNm présent dans une cellule eucaryote, notamment de mammifère, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

35 a) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules eucaryotes exprimant ledit ARNm susceptible d'être édité ;

35 b) la mise en évidence de la modulation ou non du taux d'édition dudit fragment d'ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés

dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape a) par un procédé selon l'invention pour la détection et/ou la quantification de tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition sur la séquence du fragment dont dérive ledit oligonucléotide cible ;

10 c) la détermination à la fin de l'étape c) du procédé ci-avant cité à l'étape b) et pour chacune desdites sondes, du taux d'édition correspondant au rapport exprimé en pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes ;

d) le cas échéant, en ce que l'on compare le taux d'édition obtenu à celui obtenu pour une population de cellules témoin ; et

e) la sélection de ce composé si celui module le taux d'édition dudit fragment d'ARNm.

L'humeur est cette disposition affective de base qui fait osciller l'être humain de la joie la plus extrême à la douleur la plus profonde, en fonction des événements et des émotions qui commandent ses réponses, en lui permettant de s'adapter, au mieux, à son environnement social, affectif, familial et professionnel. La régulation de l'humeur est un processus complexe qui fait intervenir des neuromédiateurs appartenant aux trois systèmes monoaminergiques, c'est-à-dire noradrénergique, 20 sérotoninergique et dopaminergique. Ces neuromédiateurs agissent via des récepteurs situés dans la membrane plasmique. Lorsque ces récepteurs sont des récepteurs canaux, la liaison du ligand en module l'activité, alors que lorsqu'ils sont couplés à des effecteurs intracellulaires, la liaison des mêmes ligands conduira à une transduction d'un signal à travers la membrane plasmique. Cette transduction du signal est la conséquence d'un changement de conformation du récepteur à la suite de la liaison du ligand à la partie extracellulaire du récepteur. La spécificité de la réponse de la cellule à ces neuromédiateurs dépend, d'une part, de la nature du récepteur et donc du type d'interaction qu'il va provoquer à l'intérieur de la cellule, à la suite de son changement de conformation et, d'autre part, de la nature des cascades de réactions 25 biochimiques ainsi induites qui seront propres au type de cellule concernée.

Il n'existe pas un récepteur responsable, à lui seul, de la régulation de l'humeur, en réponse à un neuromédiateur unique, d'autant que l'expression des gènes de ces récepteurs est interconnectée. Cependant, parmi les nouveaux antidépresseurs dits de seconde génération - ils n'appartiennent ni à la famille des antidépresseurs tricycliques, ni à celle des inhibiteurs de la mono-amine-oxydase

(IMAO) - certains d'entre eux comme la fluvoxamine (Floxyfral[®]), la fluoxétine (Prozac[®]) et la paroxétine (Deroxat[®]) sont considérés comme de puissants et, surtout, spécifiques inhibiteurs de la recapture de la sérotonine dans la fente synaptique (voir à ce propos, Goodnick et al. *J. Psychopharmacol.* 1998, 12(3) (Suppl B) S5-20).

5 Autrement dit, les antidépresseurs de cette famille agissent en entraînant une augmentation de la concentration de sérotonine dans la fente synaptique, forçant ainsi une transduction du signal qui serait trop faible, soit par insuffisance de sérotonine, soit par insuffisance des récepteurs de la sérotonine, en nombre, ou en efficacité à transduire le signal.

10 La sérotonine ou 5 hydroxytryptamine (5-HT) est un neuromédiateur qui entraîne des effets physiologiques extrêmement variés, par liaison à des récepteurs de sous-types différents. La famille 5-HT₂ des récepteurs de la sérotonine appartient au grand groupe des récepteurs sept fois trans-membranaires couplés aux protéines G trimériques. Cette famille comprend trois sous-types de récepteurs (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}) qui, par l'intermédiaire de protéines Gq, activent une phospholipase C β . Cette dernière, une fois activée, hydrolyse des phospholipides membranaires avec, pour conséquence, une augmentation des concentrations intra-cellulaires des inositol-phosphates (InsP) et apparition de diacylglycérol (DAG) qui reste associé à la membrane plasmique. Les récepteurs du sous-type 5-HT_{2C} (5-HT_{2C-R}) sont présents

15 dans le système nerveux central, y compris le cortex, le striatum, l'hypothalamus, le bulbe olfactif et le plexus choroïde. Le 5-HT_{2C-R} est très certainement le ou l'un des récepteurs de la sérotonine impliqué dans la régulation de l'humeur. Il apparaît également impliqué dans la perception du désir sexuel (voir à ce propos, Lane, J. *Psychopharmacol.* 1997, 11(1), 72-82), ainsi que dans la sensation de faim (voir à ce propos, Bickerdike et al. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 1999, 1:207-214). Sur la

20 classification des récepteurs de la sérotonine de la famille 5-HT₂ et leur mode de transduction du signal, on se référera à Baxter et al. (*Trends Pharmacol. Sci.*, 1995, 16(3):105-110), ainsi qu'à Roth et al. (*Pharmacol Ther.*, 1998, 79(3):231-257) et aux articles qui y sont référencés. De même, pour la caractérisation pharmacologique des

25 récepteurs 5-HT₂, on se référera à Jerman et al. (*Eur. J. Pharm.* 2001, 414, 23-30) et aux articles qui y sont référencés. Enfin, on trouvera la séquence complète de l'ADNc du 5-HT_{2C-R}, la structure de son gène et la description des épissages alternatifs du transcript primaire de ce dernier, dans Xie et al. (*Genomics*, 1996, 35, 551-561), ainsi

30

que les séquences correspondantes dans les banques de données de GenBank/EMBL sous le N° U49516 pour l'ADNc et le N° U49648 pour les séquences situées en 5' du gène.

Conformément au mode de fonctionnement des récepteurs sept fois transmembranaires couplés aux protéines Gq trimériques dont la sous-unité α q active une phospholipase C β , la stimulation du 5-HT_{2C}-R par la sérotonine entraîne l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) et DAG. Le DAG ainsi produit, active à son tour, une protéine kinase C qui conduira à une modification de l'expression génique, par l'intermédiaire d'une cascade de réactions biochimiques. La spécificité de cette modification de l'expression génique dépend du type de cellule concernée. L'IP3 produit par l'hydrolyse du PIP2 est une petite molécule hydrosoluble qui diffuse rapidement dans le cytosol où elle entraîne une libération de calcium en provenance du réticulum endoplasmique par interaction avec des récepteurs canaux. Cette augmentation soudaine de concentration de calcium intra-cytosolique entraîne une réponse cellulaire immédiate par modification de l'activité de protéines dont la présence entraîne la spécificité de réponse du type de cellule concernée. Deux mécanismes contrôlent la cessation de la réponse cellulaire par abaissement de la concentration du calcium intracytosolique. Le premier est le résultat du pompage du calcium hors du cytosol, principalement hors de la cellule, le second est la conséquence de l'inactivation rapide de l'IP3, principalement par sa déphosphorylation par des phosphatases spécifiques.

L'étape de déphosphorylation de l'IP3 est la cible de cet autre agent pharmacologique que sont les sels de lithium, carbonate (Téralithe[®]) et gluconate (Neurolithium[®]) de lithium. Utilisés dans les années 1850 dans le traitement de la goutte, puis à la fin du XIX^e siècle dans le traitement de la manie, tombés dans l'oubli jusqu'au milieu du XX^e siècle, les sels de lithium sont à nouveau utilisés avec un succès remarquable depuis le début des années 1970 dans le traitement des phases maniaques, en particulier dans les psychoses maniaco-dépressives où ils s'avèrent, de plus, une prophylaxie efficace des rechutes des troubles bipolaires de l'humeur. Les sels de lithium inhibent l'activité de l'inositol-1-phosphatase responsable de l'entièvre déphosphorylation de l'IP3 qui conduit à la formation et au recyclage de l'inositol indispensable à la synthèse du PIP2. Dans ces conditions, la diminution de la concentration de PIP2 à la face intracellulaire de la membrane plasmique n'est autre qu'une diminution du substrat de la phospholipase C- β activée, dont la conséquence est un freinage des effets de l'activation des récepteurs couplés aux protéines Gq

trimériques. Autrement dit, les sels de lithium agiraient, entre autres, en entraînant une diminution du PIP2 disponible, freinant ainsi une transduction du signal qui serait trop importante, soit par excès de sérotonine, soit par excès de récepteurs de la sérotonine, en nombre ou en efficacité à transduire le signal (sur la compréhension 5 actuelle du mode d'action des sels de lithium, voir Coyle et al. 2002, *Nature Medicine*, 8(6), 557-558, avec les articles qui y sont référencés).

Le 5-HT_{2C}-R apparaît donc comme une des molécules-clef de la réponse à la sérotonine dans la régulation de l'humeur puisqu'il permet une réponse de la cellule dont l'amplitude dépend de son efficacité à transduire le signal. Il n'existe qu'un seul 10 gène du 5-HT_{2C}-R, porté par le chromosome X, donc un seul allèle de ce gène chez l'homme et deux chez la femme dont l'un potentiellement inactif par inactivation de l'un des deux chromosomes X. Par conséquent, il faudrait s'attendre à ce que seuls la concentration de sérotonine extracellulaire et le nombre de récepteurs présents à la membrane à un moment donné, participent à l'efficacité de la transduction du signal en 15 réponse à la sérotonine. En effet, si l'existence d'épissages différentiels du pré-ARNm du 5-HT_{2C}-R a bien été démontrée, il semble qu'une seule forme du 5-HT_{2C}-R puisse être sept fois trans-membranaire et active. Cependant, il existe au moins vingt-quatre sortes de récepteurs différents, produits d'expression du même gène car ils sont le 20 résultat d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique appelé édition.

L'édition est le mécanisme par lequel l'information contenue dans le gène est modifiée après la transcription. On regroupe sous le terme général d'édition des ARNm, la modification de la séquence de ces ARNm qui conduit à un changement, en nature ou en nombre, des aminoacides incorporés dans la protéine au cours de la traduction, la séquence de la protéine ne pouvant plus être déduite de celle du gène 25 qui en dirige la synthèse. L'ARN pré-messager du 5-HT_{2C}-R peut subir une modification enzymatique spécifique de certaines adénosines (A), dans la partie de ce qui deviendra l'ARNm définitif qui dirige l'incorporation des aminoacides situés dans la deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R. En effet, la partie distale du cinquième 30 exon et la partie proximale du cinquième intron du transcrit primaire sont susceptibles de former une structure en tige-boucle potentiellement reconnue par deux enzymes, ADAR1 et ADAR2 (adénosine désaminase dépendante de l'ARN double brin) qui permettent d'éditer l'ARN pré-messager, avant son épissage. Cette édition est produite par désamination de A qui sont alors transformées en inosine (I). Une fois l'épissage

achevé la partie de l'ARNm qui contenait les A ayant subi l'édition, contient maintenant des I. Lors de la traduction de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, on pense que les I sont lues comme des G. En effet, lors de la synthèse *in vitro* de l'ADNc de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R ayant subi la désamination des A en I, la transcriptase inverse incorpore des dC en face des I, à la place des dT qui auraient dû normalement être incorporées en face des A. Par conséquent, lors de la synthèse du second brin qui conduit à la formation de l'ADNc double brin, une dG est introduite en face de chaque dC incorporée dans le premier brin. Le séquençage de l'ADNc double brin ainsi obtenu permet de constater le remplacement des dA par des dG, en raison de la désamination initiale des A en I dans l'ARNm ayant subi l'édition. Par conséquent, l'édition de l'ARNm conduit à une modification de la signification des codons dans lesquels les A sont remplacées par des I qui seraient donc lues comme des G (plus spécifiquement, sur l'édition du 5-HT_{2C}-R humain, voir Fitzgerald et al. *Neuropsychopharmacology*, 1999, 21(2S), 82S-90S).

Compte tenu de ce qui a été décrit ci-dessus concernant, d'une part le mode d'action des antidépresseurs de seconde génération qui agissent en augmentant la concentration de sérotonine par inhibition de sa recapture et, d'autre part, le mode d'action des sels de lithium qui agissent sur la manie en limitant la disponibilité en PIP2, le degré (ou taux) d'édition du 5-HT_{2C}-R joue très certainement un rôle dans la régulation de l'humeur. Dans ce sens, l'étude de Niswander et al. (*Neuropsychopharmacol.*, 2001, 24, 478-491) pratiquée post-mortem, a mis en évidence que l'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, en particulier du site A, était statistiquement plus élevée dans le cortex pré-frontal du cerveau de patients décédés par suicide que dans la même aire du cerveau de patients décédés pour d'autres raisons.

On peut également citer une autre étude effectuée par Gurevich et al. (*Neuron*, 2002, 34(3), 349-356) qui a mis en évidence que le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R était augmenté sur le site E (appelé C' dans l'article) et diminué sur le site D dans le cortex frontal du cerveau de patients décédé par suicide, alors qu'ils souffraient de dépression majeure.

Inversement, Sodhi et al. (*Mol. Psychiatry*, 2001, 6(4), 373-379) ont montré que le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, était diminué dans le cortex frontal du cerveau de patients classés comme schizophrènes.

Ainsi, un récepteur non édité conduirait à un état maniaque, alors qu'un récepteur trop édité conduirait à un état dépressif. A la lumière de cette synthèse et de son interprétation faites par l'inventeur, il a été conclu qu'une modulation de taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R entraîne une modulation de l'humeur, ceci par 5 modification de la réponse du 5-HT_{2C}-R à la stimulation par la sérotonine. Ainsi une inhibition du taux d'édition du 5-HT_{2C}-R conduira à une augmentation de la réponse à la stimulation par la sérotonine, alors qu'une stimulation ou augmentation du taux 10 d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R entraînera une diminution de cette même réponse à la stimulation par la sérotonine. Ceci se traduira, et de manière générale, par un effet antidépresseur pour les composés capables d'inhiber le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R et par un effet inhibiteur de la manie pour les composés capables de stimuler 15 ou d'augmenter le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R.

Ainsi, dans un mode particulièrement préféré, la présente invention comprend une méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du 20 fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R dans une cellule eucaryote, notamment de mammifère, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules eucaryotes exprimant le gène dudit ARNm ;
- 20 b) la mise en évidence de la modulation ou non du taux d'édition dudit fragment d'ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape a) par un procédé selon l'invention pour la détection et/ou la quantification de tout oligonucléotide cible présent dans un échantillon et dérivé d'un fragment de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit fragment 25 comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') édité ou non édité ;
- c) la détermination à la fin de l'étape c) du procédé ci-avant cité à l'étape b) et pour chacune desdites sondes, du taux d'édition correspondant au rapport exprimé en 30 pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes ;
- d) le cas échéant, en ce que l'on compare le taux d'édition obtenu à celui obtenu pour une population de cellules témoin ; et

e) la sélection de ce composé si celui-ci module le taux d'édition dudit fragment d'ARNm.

Sous un aspect particulier, la présente invention comprend une méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape e), on sélectionne le composé si celui-ci diminue le taux d'édition d'au moins un site d'édition dudit fragment d'ARN, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés de la deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R, notamment si cette diminution du taux d'édition augmente la capacité des cellules exprimant le gène du 5-HT_{2C}-R à répondre à une stimulation par la sérotonine.

Sous un autre aspect particulier, la présente invention comprend une méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R selon l'invention, caractérisé en ce qu'à l'étape e), on sélectionne le composé si celui-ci augmente le taux d'édition d'au moins un site d'édition dudit fragment d'ARN, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés de la deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R, notamment si cette augmentation du taux d'édition diminue la capacité des cellules exprimant le gène du 5-HT_{2C}-R à répondre à une stimulation par la sérotonine.

Sous encore un autre aspect, la présente invention comprend l'utilisation d'un composé capable de moduler le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit composé ayant été sélectionné ou étant susceptible d'être sélectionné par un procédé de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R dans une cellule eucaryote, notamment de mammifère selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à moduler l'humeur chez un patient nécessitant un tel traitement, notamment pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée soit au traitement de la dépression si ce composé sélectionné diminue le taux d'édition dudit site d'édition, soit au traitement de la manie ou de certaines formes de schizophrénie si ce composé sélectionné augmente le taux d'édition dudit site d'édition.

Sous encore un autre aspect, la présente invention a pour objet un composé ayant une activité modulatrice du taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la

séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R pour le traitement de l'humeur.

Pour les troubles de l'humeur pouvant être améliorés par des médicaments modulant l'édition du 5-HT_{2C}-R, on pourra se référer à l'ouvrage "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, text revision, published by the American Psychiatric Association, Washington DC, 2000, DSM-IV™".

On peut citer de manière particulière pour les dépressions :

- la dépression majeure caractérisée par un ou plusieurs épisodes dépressifs (c'est-à-dire au moins 2 semaines d'humeur dépressive avec perte d'intérêt accompagnée par au moins 4 symptômes additionnels de la dépression) (voir DSM-IV p349-369) ;
- la dépression bipolaire :
 - bipolaire I : caractérisée par un ou plusieurs épisodes maniaques ou mixtes, généralement accompagnés d'épisodes de dépression majeures (voir DSM-IV p382),
 - bipolaire II : caractérisée par un ou plusieurs épisodes de dépression majeure accompagnés par au moins un épisode hypomaniaque (voir DSM-IV p392), et
 - les troubles cyclothymiques : caractérisés par au moins deux semaines de nombreuses périodes de symptômes hypomaniaques et de symptômes dépressifs (voir DSM-IV p398) ;
 - la mélancolie : les états mélancoliques se rencontrent chez les dépressifs majeurs ainsi que chez les dépressifs bipolaires. Cet état est caractérisé par une perte d'intérêt et/ou de plaisir dans toutes les activités, ainsi que par une diminution de la réactivité aux stimuli déclenchant habituellement le plaisir (voir DSM-IV p419) ; et
 - la schizophrénie : caractérisée par des troubles durant au moins six mois et incluant au moins un mois de symptômes positifs (délusions, hallucination, désorganisation du langage) et symptômes négatifs (de type dépressifs) (voir DSM-IV p298).

Sous cet autre aspect, la présente invention a pour objet particulier un composé capable de diminuer le taux d'édition d'au moins un site d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés de la deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R, pour le traitement de la dépression, notamment si cette diminution du taux d'édition augmente la capacité des cellules exprimant le gène du 5-HT_{2C}-R à répondre à une stimulation par la sérotonine.

Sous cet autre aspect, la présente invention a encore pour objet particulier un composé capable d'augmenter le taux d'édition d'un site d'édition du fragment d'ARN composé comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés de la deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R, pour le traitement de la maladie ou de certaines formes de schizophrénie, notamment si cette augmentation du taux d'édition diminue la capacité des cellules exprimant le gène 5-HT_{2C}-R à répondre à une stimulation par la sérotonine.

Les exemples suivants ont été choisis pour fournir à l'homme de l'art une description complète afin de pouvoir réaliser et utiliser la présente invention. Ces exemples ne sont pas destinés à limiter la portée de ce que l'inventeur considère comme son invention, ni destinées à montrer que seules les expériences ci-après ont été effectuées.

15 **EXEMPLE 1 :** Méthode permettant de déterminer, par hybridation spécifique et en une seule étape, le pourcentage de chacune des trente-deux formes de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R.

La méthode décrite ci-après permet de déterminer, par hybridation spécifique et en une seule étape, le pourcentage de chacune des trente-deux formes de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R même si l'amplification de l'information contenue dans ces ARNm a été nécessaire.

Après édition des ARNm, les A sont remplacées par des I qui sont, à leur tour, remplacées par des dG dans l'ADNc. Autrement dit, plus le nombre de A transformées en I au cours de l'édition de l'ARNm initial est grand, plus la température nécessaire à une hybridation spécifique est élevée. Le remplacement des dG par des dI permet d'effectuer les hybridations à une température unique selon la stratégie décrite ci-dessous.

Si nécessaire, en raison d'une quantité d'ARNm de départ trop faible, l'information amplifiée *in vitro* peut l'être sous forme d'ARN simple brin, de façon linéaire par transcription *in vitro* (IVT pour "in vitro transcription") ; elle peut l'être aussi sous forme d'ADN double brin par RT-PCR après transcription inverse (RT pour "reverse transcription") de l'ARNm suivie d'une amplification exponentielle par PCR. Que l'information soit amplifiée sous la forme finale d'un ARN simple brin ou sous celle d'un ADN double brin, pose le problème de l'identification des I puisque, dans tous les

cas, au cours de la synthèse de l'ADNc par la transcriptase inverse, une dC est incorporée en face de chaque I et, lors de la synthèse du brin complémentaire, une dG est ensuite incorporée en face de chaque dC. Ceci revient à dire que si les séquences qui sont hybridées aux différentes sondes sont celles complémentaires des ARNm initiaux, elles contiennent des dT ou des U en face de chaque A non éditée et des dC ou des C en face de chaque I, selon que les séquences ont été obtenues sous forme d'ADN par RT-PCR ou sous forme d'ARN par IVT.

5 Dans le cas où l'information contenue dans les ARNm de départ est amplifiée par IVT du brin sens, les molécules d'ARN synthétisées présentent une séquence identique à celle des ARNm mais dont les A, éditées en I, sont remplacées par des G. Inversement, l'IVT du brin anti-sens permet de synthétiser des molécules d'ARN dont la séquence est complémentaire de celle des ARNm de départ mais avec des C qui remplacent les U en face des sites édités de A en I.

10 Par conséquent, pour que les températures d'hybridation soient identiques pour toutes les sondes, les ADN simple brin déposés sous forme de sondes sur le support sont de séquence identique à celles des ARNm initiaux mais dans lesquelles des dA remplacent les A non éditées et des dI remplacent des I provenant de l'édition de ces A en I. Ainsi, que les ARN initiaux aient été amplifiés par RT-PCR sous forme d'ADN double brin ou par IVT sous forme d'ARN antisens des ARNm initiaux, il y aura toujours formation de deux liaisons hydrogènes entre dA et dT ou U d'une part et entre dI et dC ou C d'autre part.

15 Les séquences des trente-deux sondes nécessaires à l'identification des différentes formes, éditées ou non, de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R sont rapportées ci-dessous.

20 Les Tm ayant été mesurées individuellement pour chacune des sondes, toutes les conditions autres que la température étant identiques par ailleurs, la température d'hybridation pour l'ensemble des sondes est choisie entre les deux Tm extrêmes mesurées, ici pour la sonde de séquence SEQ ID No. 1 et la sonde de séquence SEQ ID No. 32.

25 Les conditions autres que la Tm auront été définies de façon à ce que l'écart entre les deux Tm extrêmes mesurées soient le plus faible possible.

30 Les différentes formes initiales de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R sont quantifiées par mesure soit de la radioactivité, soit de l'intensité de fluorescence des trente-deux séquences appariées. La somme des trente-deux valeurs mesurées étant directement

proportionnelle à la somme des différentes formes initiales de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, le pourcentage de chacune des formes de cet ARNm peut être déduit en divisant la valeur mesurée individuellement pour chaque forme par la somme des valeurs des trente-deux formes.

5

	Sites d'édition	A	B	EC	D
1	5-HT _{2C} R-0			d(CAATACGTAATCCTATT)	SEQ ID No. 1
	I-N-I				
2	5-HT _{2C} R-A			d(CAITACGTAATCCTATT)	SEQ ID No. 2
10	V-N-I				
3	5-HT _{2C} R-B			d(CAATICGTAATCCTATT)	SEQ ID No. 3
	M-N-I				
4	5-HT _{2C} R-C			d(CAATACGTAITCCTATT)	SEQ ID No. 4
	I-S-I				
15	5	5-HT _{2C} R-D		d(CAATACGTAATCCTITT)	SEQ ID No. 5
	I-N-V				
6	5-HT _{2C} R-E			d(CAATACGTAITCCTATT)	SEQ ID No. 6
	I-D-I				
7	5-HT _{2C} R-AB			d(CAITACGTAATCCTATT)	SEQ ID No. 7
20	V-N-I				
8	5-HT _{2C} R-AC			d(CAITACGTAITCCTATT)	SEQ ID No. 8
	V-S-I				
9	5-HT _{2C} R-AD			d(CAITACGTAATCCTITT)	SEQ ID No. 9
	V-N-V				
25	10	5-HT _{2C} R-AE		d(CAITACGTAITCCTATT)	SEQ ID No. 10
	V-D-I				
11	5-HT _{2C} R-BC			d(CAATICGTAITCCTATT)	SEQ ID No. 11
	M-S-I				
12	5-HT _{2C} R-BD			d(CAATICGTAATCCTITT)	SEQ ID No. 12
30	M-N-V				

13 5-HT_{2C} R-BE d(CAATICGTIATCCTATT) SEQ ID No. 13
M-D-I
14 5-HT_{2C} R-CD d(CAATACGTAITCCTITT) SEQ ID No. 14
I-S-V
5 15 5-HT_{2C} R-CE d(CAATACGTTIITCCTATT) SEQ ID No. 15
I-G-I
16 5-HT_{2C} R-DE d(CAATACGTTIATCCTITT) SEQ ID No. 16
I-D-V
17 5-HT_{2C} R-ABC d(CAITICGTIATCCTATT) SEQ ID No. 17
10 V-S-I
18 5-HT_{2C} R-ABD d(CAITICGTAAATCCTITT) SEQ ID No. 18
V-N-V
19 5-HT_{2C} R-ABE d(CAITICGTIATCCTATT) SEQ ID No. 19
V-D-I
15 20 5-HT_{2C} R-ACD d(CAITACGTTIATCCTITT) SEQ ID No. 20
V-S-V
21 5-HT_{2C} R-ACE d(CAITACGTTIITCCTATT) SEQ ID No. 21
V-G-I
22 5-HT_{2C} R-ADE d(CAITACGTTIATCCTITT) SEQ ID No. 22
20 V-D-V
23 5-HT_{2C} R-BCD d(CAATICGTIATCCTITT) SEQ ID No. 23
M-S-V
24 5-HT_{2C} R-BCE d(CAATICGTIITCCTATT) SEQ ID No. 24
M-G-I
25 25 5-HT_{2C} R-BDE d(CAATICGTIATCCTITT) SEQ ID No. 25
M-D-V
26 5-HT_{2C} R-CDE d(CAATACGTTIITCCTITT) SEQ ID No. 26
I-G-V
27 5-HT_{2C} R-ABCD d(CAITICGTIATCCTITT) SEQ ID No. 27
30 V-S-V

28 5-HT_{2C} R-ABCE d(CAITICGTIITCCTATT) SEQ ID No. 28
 V-G-I
 29 5-HT_{2C} R-ABDE d(CAITICGTIATCCTITT) SEQ ID No. 29
 V-D-V
 5 30 5-HT_{2C} R-ACDE d(CAITACGTIITCCTITT) SEQ ID No. 30
 V-G-V
 31 5-HT_{2C} R-BCDE d(CAATICGTIITCCTITT) SEQ ID No. 31
 M-G-V
 32 5-HT_{2C} R-ABCDE d(CAITICGTIITCCTITT) SEQ ID No. 32
 10 V-G-V

EXAMPLE 2 : Exemple de réalisation

L'exemple de réalisation développé ci-dessous concerne l'édition des ARNm avec, pour application, celle des ARNm de l'un des récepteurs de la sérotonine. Cet exemple montre qu'il est possible d'effectuer une hybridation dans des conditions de température unique, même lorsque le pourcentage de guanines et cytosines initialement appariées passe de moins de 30 % à près de 60 %, dans une séquence courte.

Cinq adénosines sont potentiellement éditable dans trois codons différents ce qui conduit à $2^5 = 32$ combinaisons différentes de séquences d'ARNm et $3 \times 4 \times 2 = 24$ combinaisons différentes de séquences en aminoacides (voir schéma ci-dessous). La désamination des adénosines aux cinq sites éditable, notés de A à E, conduit au remplacement de trois aminoacides de la deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R. Le 5-HT_{2C}-R synthétisé par traduction de l'ARNm non édité (SEQ ID No. 34) est constitué des aminoacides I-N-I (isoleucine – asparagine – isoleucine) dans la deuxième boucle intracellulaire, tandis que celui synthétisé par traduction de l'ARNm complètement édité (SEQ ID No. 35) ou édité simultanément aux sites A, E, C et D est constitué des aminoacides V-G-V (valine – glycine – valine), les codons IUI ou IUA spécifiant tous les deux l'incorporation d'une valine, si I est effectivement lue comme G. Les codons AUI, AIU et IAU spécifiant respectivement l'incorporation de M (méthionine), S (sérine) et D (acide aspartique), vingt-quatre combinaisons d'aminoacides sont effectivement possibles dans la deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R, pour trente-deux combinaisons de séquences différentes de son ARNm.

	A	B	EC	D	Sites d'édition		
	5'-CA	AUA	CGU	AAU	CCU	AUU-3'	ARNm du 5-HT _{2C} -R non édité
	I	R	N	P	I		Aminoacides du 5-HT _{2C} -R (ARNm non édité)
5	5'-CA	IUI	CGU	IIU	CCU	IIU-3'	ARNm du 5-HT _{2C} -R tout édité
	V		G		V		Aminoacides du 5-HT _{2C} -R (ARNm tout édité)
		IUA					Édition du site A
		V					Aminoacide du 5-HT _{2C} -R (ARNm édité au site A)
10		AUI		AIU			Édition des sites B et C
		M		S			Aminoacides du 5-HT _{2C} -R (ARNm édité aux sites B et C)
15			IAU				Édition du site E
			D				Aminoacide du 5-HT _{2C} -R (ARNm édité au site E)

La deuxième boucle intracellulaire du 5-HT_{2C}-R est impliquée dans le couplage du récepteur aux protéines Gq trimériques. Un 5-HT_{2C}-R (I-N-I) synthétisé par traduction de l'ARNm non édité présente une activité constitutive de couplage, donc une activation permanente de la phospholipase C β , tandis qu'un 5-HT_{2C}-R (V-G-V) synthétisé par traduction d'un ARNm complètement édité répond moins bien à la stimulation par la sérotonine par défaut de couplage aux protéines Gq trimériques. Autrement dit, selon son degré d'édition, le 5-HT_{2C}-R présentera une aptitude plus ou moins grande à répondre à la stimulation par la sérotonine.

Pouvoir mesurer le pourcentage représenté par chacune des trente-deux formes possibles d'ARNm, revient à prédire le pourcentage de chacune des vingt-quatre formes du 5-HT_{2C}-R et, par conséquent, à pouvoir estimer indirectement l'efficacité de réponse du 5-HT_{2C}-R à la stimulation par la sérotonine. Deux méthodes ont été utilisées pour estimer les pourcentages des formes différentes d'ARNm du 5-HT_{2C}-R. Ces deux méthodes ne donnent pas des renseignements équivalents.

La première méthode, techniquement la plus lourde et la plus coûteuse, permet d'estimer statistiquement le pourcentage de chacune des trente-deux formes de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R. Elle consiste à synthétiser simultanément tous les ADNc des ARNm du 5-HT_{2C}-R grâce à des amorces spécifiques communes aux différentes formes d'ARNm, puis à insérer tous ces ADNc dans des plasmides qui sont ensuite transférés dans des bactéries. Après transformation et sélection, ces dernières sont

ensuite clonées. Ces bactéries clonées sont alors amplifiées, puis l'ADN plasmidique en est extrait, purifié et les ADNc insérés sont alors séquencés. Si le nombre d'ADNc clonés et séquencés est suffisant pour être statistiquement représentatif de la population initiale d'ADNc donc d'ARNm, le pourcentage de chacune des formes initiales d'ARNm du 5-HT_{2C}-R pourra alors être déduit. Si ce nombre est insuffisant, seules les formes majoritaires de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R seront statistiquement représentées.

La seconde méthode est plus rapide à mettre en œuvre mais elle ne permet pas d'estimer le pourcentage de chacune des trente-deux formes de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R. Elle permet, en revanche, de déterminer le pourcentage de chaque A éditée en I, à chacun des cinq sites éditables. Pour cela, après synthèse des ADNc comme dans le cas précédent, il est procédé à une extension d'amorce, en présence de trois des quatre désoxyribonucléosides triphosphates habituels et d'un didésoxyribonucléoside triphosphate qui termine l'extension de l'amorce en face du désoxyribonucléoside dont on veut déterminer la nature. Par exemple les trois désoxyribonucléosides triphosphates peuvent être dATP, dGTP et dTTP, alors que le didésoxyribonucléoside triphosphate est le ddCTP (didésoxycytidine triphosphate) qui, en s'incorporant en face de la première dG rencontrée, arrête l'extension de l'amorce là où se trouvait une I dans l'ARNm qui a servi de matrice à la synthèse de l'ADNc. Dans le cas où l'adénosine initiale n'aurait pas été éditée et donc remplacée par une dG dans l'ADNc, l'amorce est allongée jusqu'à la première dG qui suit la dA provenant de l'adénosine non éditée. Dans ces conditions, les amorces doivent être judicieusement choisies, complémentaires de l'un ou l'autre des deux brins de l'ADNc et doivent, en outre, avoir été marquées au ³²P en 5', pour être visualisées par autoradiographie après séparation par électrophorèse en gel de polyacrylamide. La mesure de la radioactivité contenue dans les différents fragments séparés permet d'estimer le pourcentage de A édités à chacun des cinq sites éditables. Il faut, au moins, autant d'amorces qu'il y a de sites éditables.

REVENDICATIONS

1/ Méthode d'analyse d'un échantillon contenant un polynucléotide cible, et/ou l'un de ses variants, ledit variant comprenant une ou plusieurs substitutions de base par rapport audit polynucléotide cible, ladite méthode comprenant les étapes suivantes :

5 a) la mise à disposition de l'échantillon contenant ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, et d'au moins deux oligodésoxyribonucléotides différents, ci-après désignés par le terme général de "sondes", ces dernières étant disposées soit de manière distincte sur un support solide, soit contenues dans un même réacteur, soit encore réparties de manière distincte sur un dispositif comprenant un ensemble de réacteurs, chacune desdites sondes présentant une séquence susceptible de former un duplex spécifique avec le polynucléotide cible ou l'un de ses variants attendus ;

10 b) l'incubation dudit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, avec lesdites sondes dans des conditions d'hybridation spécifique, permettant d'obtenir la formation d'un duplex entre ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, et une desdites sondes même si ledit polynucléotide cible, et l'un de ses variants attendus ne diffèrent entre eux que d'un seul nucléotide ; et

15 c) la détection des duplex formés sur ledit support solide, ou encore formés en solution dans ledit même réacteur ou formés en solution dans chacun des réacteurs dudit ensemble de réacteurs,

20 caractérisée en ce qu'au moins un des nucléotides dG dans au moins une desdites sondes, a été substitué par un nucléotide dI, de telle façon que les conditions d'hybridation spécifique permettant d'obtenir la formation d'un duplex entre ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, et une desdites sondes à l'étape 25 b) sont identiques pour chacune desdites sondes.

2/ Méthode d'analyse selon la revendication 1, caractérisée en ce que à l'étape a) lesdites au moins deux sondes différentes sont disposées de manière distincte sur un support solide, soit contenues en solution dans un même réacteur, soit encore 30 réparties en solution de manière distincte sur un dispositif comprenant un ensemble de mêmes réacteurs, et en ce qu'à l'étape c), respectivement, les duplex formés sont détectés sur le support solide, les duplex formés en solution sont détectés dans ledit même réacteur ou dans chacun des réacteurs dudit ensemble de même réacteurs.

3/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG

35

REVENDICATIONS

1/ Jeu d'au moins deux sondes oligodésoxyribonucléotidiques différentes contenant une séquence susceptible de former un duplex spécifique avec un polynucléotide cible, ou l'un de ses variants, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué d'un ou comprend un ensemble de sondes distinctes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon, la présence potentielle de tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm codant pour un récepteur membranaire de cellule de mammifère susceptible de comporter au moins un site d'édition dans la séquence de ce fragment, et en ce qu'au moins un des nucléotides dG sur au moins une desdites sondes a été substitué par un nucléotide dI, de telle façon que les conditions d'hybridation sont identiques pour chacune desdites sondes.

2/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI dans lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que les Tm des duplex pouvant être formés avec chacune desdites sondes sont identiques ou suffisamment proches pour permettre l'obtention desdits duplex par hybridation spécifique dans les mêmes conditions d'hybridation pour chacune desdites sondes.

3/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que le nombre de dG restants susceptibles de s'apparier à dC ou à C dans lesdits duplex est identique ou peu différent pour chacune desdites sondes.

4/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdites sondes sont de type ADN monocaténaire.

5/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites sondes comprennent un petit nombre de bases, de préférence égal ou inférieur à 20 bases.

6/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que lesdites sondes mettent en jeu un nombre identique de bases ou un nombre de bases différent au plus de 10 %.

7/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le nombre desdites sondes différentes est au moins égal au nombre de variants attendus dudit polynucléotide cible dont l'un au moins est susceptible d'être présent dans ledit échantillon à analyser.

par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que les températures de fusion (Tm) des duplex pouvant être formés entre une desdites sondes et ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, sont identiques ou suffisamment proches pour permettre l'obtention desdits duplex par hybridation spécifique dans les mêmes conditions d'hybridation pour chacune desdites sondes.

5 4/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que le nombre de dG restants susceptibles de s'apparier à dC ou à C dans lesdits duplex est identique ou peu différent pour chacune desdites sondes.

10 5/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit polynucléotide cible ou l'un de ses variants attendus est de type ADN simple brin ou ARN simple brin.

15 6/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que lesdites sondes comprennent un petit nombre de bases, de préférence égal ou inférieur à 20 bases.

7/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que lesdites sondes et ledit polynucléotide cible ou l'un de ses variants attendus, mettent en jeu un nombre de bases différent d'au plus de 10 %.

20 8/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit polynucléotide cible, ou l'un de ses variants attendus, est préalablement marqué par un marqueur capable d'engendrer, directement ou indirectement un signal détectable.

9/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que ledit support est un support solide choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon®, en silicium, en silicium ou en polyoses.

25 10/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que ledit échantillon à analyser contient ledit polynucléotide cible et l'un au moins de ses variants attendus.

30 11/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le nombre desdites sondes différentes est au moins égal au nombre de variants attendus dudit polynucléotide cible dont l'un au moins est susceptible d'être présent dans ledit échantillon à analyser.

8/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le nombre desdites sondes dont au moins un des nucléotides dG a été substitué par un nucléotide dI est au moins égal à deux.

9/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 5, 8, caractérisé en ce que ledit récepteur est le récepteur 5-HT_{2c} (5-HT_{2c}-R) de la sérotonine ou la sous-unité B du récepteur du glutamate (GluR-B).

10 Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué d'un ou comprend un ensemble de trente-deux sondes distinctes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm, édité ou non édité, du 5-HT_{2c}-R, ledit jeu étant constitué ou comprenant les ensembles de sondes suivants :

- l'ensemble des trente-deux sondes de séquence SEQ ID Nos. 1 à 32 suivantes :
 - 5'-CAATACGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 1),
 - 15 5'-CAITACGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 2),
 - 5'-CAATICGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 3),
 - 5'-CAATACGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 4),
 - 5'-CAATACGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 5),
 - 5'-CAATACGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 6),
 - 20 5'-CAITICGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 7),
 - 5'-CAITACGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 8),
 - 5'-CAITACGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 9),
 - 5'-CAITACGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 10),
 - 5'-CAATICGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 11),
 - 25 5'-CAATICGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 12),
 - 5'-CAATICGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 13),
 - 5'-CAATACGTAITCCTITT-3' (SEQ ID No. 14),
 - 5'-CAATACGTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 15),
 - 5'-CAATACGTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 16),
 - 30 5'-CAITICGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 17),
 - 5'-CAITICGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 18),
 - 5'-CAITICGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 19),
 - 5'-CAITACGTAITCCTITT-3' (SEQ ID No. 20),
 - 5'-CAITACGTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 21),
 - 35 5'-CAITACGTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 22),

12/ Méthode d'analyse d'un échantillon selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le nombre desdites sondes dont au moins un des nucléotides dG a été substitué par un nucléotide dI est au moins égal à deux.

13/ Jeu d'au moins deux sondes oligodésoxyribonucléotidiques différentes, 5 caractérisé en ce qu'au moins un des nucléotides dG sur au moins une desdites sondes a été substitué par un nucléotide dI, de telle façon que les conditions d'hybridation sont identiques pour chacune desdites sondes, ces dernières contenant une séquence susceptible de former un duplex spécifique avec un polynucléotide cible, ou l'un de ses variants.

10 14/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 13, caractérisé en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI dans lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que les Tm des duplex pouvant être formés avec chacune desdites sondes sont identiques ou suffisamment proches pour permettre l'obtention desdits duplex par hybridation spécifique dans les mêmes conditions d'hybridation pour chacune desdites sondes.

15 15/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que le nombre et la localisation des substitutions de nucléotide dG par un nucléotide dI sur lesdites sondes sont déterminés de manière à ce que le nombre de dG restants susceptibles de s'apparier à dC ou à C dans lesdits duplex est identique ou peu différent pour chacune desdites sondes.

20 16/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que lesdites sondes sont de type ADN monocaténaire.

17/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 25 16, caractérisé en ce que lesdites sondes comprennent un petit nombre de bases, de préférence égal ou inférieur à 20 bases.

18/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 17, caractérisé en ce que lesdites sondes mettent en jeu un nombre identique de bases ou un nombre de bases différant au plus de 10 %.

19/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 30 18, caractérisé en ce que le nombre desdites sondes différentes est au moins égal au nombre de variants attendus dudit polynucléotide cible dont l'un au moins est susceptible d'être présent dans ledit échantillon à analyser.

20/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 35 19, caractérisé en ce que le nombre desdites sondes dont au moins un des nucléotides dG a été substitué par un nucléotide dI est au moins égal à deux.

5'-CAATICGTAITCCTITT-3' (SEQ ID No. 23),
5'-CAATICGTTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 24),
5'-CAATICGTTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 25),
5'-CAATACGTTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 26),
5 5'-CAITICGTTAICCTITT-3' (SEQ ID No. 27),
5'-CAITICGTTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 28),
5'-CAITICGTTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 29),
5'-CAITACGTTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 30),
5'-CAATICGTTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 31), et
10 5'-CAITICGTTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 32) ; ou
- l'ensemble des trente-deux sondes de séquence comprenant les séquences des
fragments du nucléotide 3 au nucléotide 15 des SEQ ID Nos. 1 à 32.

11/ Biopuce comprenant un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une
des revendications 1 à 10 déposées sur un même support solide.

15 12/ Biopuce selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit support
solide est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon®, en
silicone, en silicium ou en polyoses.

13/ Biopuce selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que lesdites
sondes sont fixées sur ledit support solide, de préférence par liaison covalente.

20 14/ Réacteur comprenant en solution un jeu d'au moins deux sondes
différentes selon l'une des revendications 1 à 10.

15/ Dispositif, notamment une plaque ou une microplaque, constitué d'au moins
deux conteneurs, de préférence deux cupules, ledit dispositif comprenant un jeu d'au
moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 10, chacun des
25 conteneurs contenant une desdites sondes.

16/ Trousse de réactifs pour la détection, l'analyse qualitative ou quantitative
d'acides nucléiques cibles dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle comprend un
jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 1 à 10, une
biopuce selon l'une des revendications 11 à 13, ou un dispositif selon la revendication
30 15.

17/ Procédé pour la détection et/ou la quantification d'oligonucléotides cibles
dans un échantillon, ledit oligonucléotide cible étant dérivé d'un fragment d'ARNm
codant pour un récepteur membranaire de cellule de mammifère susceptible de
comporter au moins un site d'édition dans la séquence de ce fragment, caractérisé en
35 ce qu'il comprend les étapes suivantes :

21/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 20, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué ou comprend un ensemble de sondes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon, la présence d'un oligonucléotide cible et un ensemble de ses variants attendus.

5 22/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 21, caractérisé en ce que ledit oligonucléotide cible est dérivé d'un fragment de gène susceptible de comporter — ou dont le produit de transcription est susceptible de comporter — au moins une substitution de base dans la séquence dont dérive ledit oligonucléotide cible.

10 23/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que ledit oligonucléotide cible est dérivé d'un fragment d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition dans la séquence de ce fragment.

15 24/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 23, caractérisé en ce que ledit oligonucléotide cible est dérivé d'un fragment d'ARNm d'un récepteur membranaire de cellule éucaryote, notamment de mammifère.

25/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 24, caractérisé en ce que ledit récepteur est le récepteur 5-HT_{2C} (5-HT_{2C}-R) de la sérotonine ou la sous-unité B du récepteur du glutamate (GluR-B).

20 26/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 23 à 25, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué d'un ou comprend un ensemble de sondes distinctes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon, la présence potentielle de tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm, édité et non édité.

25 27/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 26, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué d'un ou comprend un ensemble de trente-deux sondes distinctes permettant de détecter et/ou de quantifier dans un échantillon tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm, édité ou non édité, du 5-HT_{2C}-R.

30 28/ Jeu d'au moins deux sondes différentes selon la revendication 27, caractérisé en ce que ledit jeu est constitué ou comprend les ensembles de sondes suivants :
- l'ensemble des trente-deux sondes de séquence SEQ ID Nos. 1 à 32 suivantes :
5'-CAATACGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 1),
5'-CAITACGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 2),

a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence sur une biopuce selon l'une des revendications 11 à 13, ou dans chacun des conteneurs du dispositif selon la revendication 15, dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec 5 lesdites sondes ;

b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par 10 hybridation spécifique au niveau de chacune desdites sondes.

18/ Procédé pour la détection et/ou la quantification d'oligonucléotides cibles dans un échantillon selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit oligonucléotide cible dérive d'un fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm, édité ou non édité, du 5-HT_{2C}-R, :

19/ Procédé de détermination du pourcentage, dans un même échantillon, de 15 chacune des formes, éditées et non éditées, d'un fragment d'ARNm codant pour un récepteur membranaire de cellule de mammifère susceptible de comporter au moins un site d'édition, par rapport à la quantité totale des formes d'ARNm éditées ou non éditées présentes dans ledit même échantillon (dénommé «taux d'édition»), 20 caractérisé en ce qu'il comprend un procédé selon la revendication 17 et en ce qu'à la fin de l'étape c) dudit procédé selon la revendication 17, on détermine pour chacune desdites sondes le rapport exprimé en pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble 25 des sondes.

20/ Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que ledit fragment d'ARNm codant pour un récepteur membranaire susceptible de comporter au moins un site d'édition est le fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm, édité ou non édité, du 5-HT_{2C}-R, et en ce qu'à l'étape a) du procédé selon la revendication 17, ladite biopuce ou les conteneurs dudit dispositif 30 comprennent un jeu de sondes selon la revendication 10.

21/ Procédé selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisé en ce que les oligonucléotides cibles sont des ARNm antisens ou des ADN complémentaires des fragments dudit ARNm édité et non édité, et en ce que lesdites sondes sont des ADN correspondant aux séquences du fragment dudit ARNm édité et non édité.

5'-CAATICGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 3),
5'-CAATACGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 4),
5'-CAATACGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 5),
5'-CAATACGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 6),
5 5'-CAITICGTAATCCTATT-3' (SEQ ID No. 7),
5'-CAITACGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 8),
5'-CAITACGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 9),
5'-CAITACGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 10),
5'-CAATICGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 11),
10 5'-CAATICGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 12),
5'-CAATICGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 13),
5'-CAATACGTAITCCTITT-3' (SEQ ID No. 14),
5'-CAATACGTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 15),
5'-CAATACGTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 16),
15 5'-CAITICGTAITCCTATT-3' (SEQ ID No. 17),
5'-CAITICGTAATCCTITT-3' (SEQ ID No. 18),
5'-CAITICGTIATCCTATT-3' (SEQ ID No. 19),
5'-CAITACGTAITCCTITT-3' (SEQ ID No. 20),
5'-CAITACGTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 21),
20 5'-CAITACGTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 22),
5'-CAATICGTAITCCTITT-3' (SEQ ID No. 23),
5'-CAATICGTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 24),
5'-CAATICGTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 25),
5'-CAATACGTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 26),
25 5'-CAITICGTAITCCTITT-3' (SEQ ID No. 27),
5'-CAITICGTIITCCTATT-3' (SEQ ID No. 28),
5'-CAITICGTIATCCTITT-3' (SEQ ID No. 29),
5'-CAITACGTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 30),
5'-CAATICGTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 31), et
30 5'-CAITICGTIITCCTITT-3' (SEQ ID No. 32) ; ou
- l'ensemble des trente-deux sondes de séquence comprenant les séquences des
fragments du nucléotide 3 au nucléotide 15 des SEQ ID Nos. 1 à 32.
29/ Biopuce comprenant un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une
des revendications 13 à 28 déposées sur un même support solide.

22/ Procédé selon l'une des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que lesdits fragments dont dérivent les oligonucléotides cibles sont des fragments d'acides nucléiques extraits à partir d'un prélèvement biologique d'un mammifère dont l'être humain.

5 23/ Procédé selon l'une des revendications 17 à 22, caractérisé en ce que les oligonucléotides cibles sont préalablement marqués par un marqueur capable d'engendrer directement ou indirectement un signal détectable, de préférence fluorescent ou radioactif.

10 24/ Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 11 à 13, ou d'un dispositif selon la revendication 15, pour la détermination du taux d'édition d'un ARNm codant pour un récepteur membranaire de cellule de mammifère.

15 25/ Méthode de sélection d'un composé capable de moduler l'édition d'un site d'édition situé sur un fragment d'un ARNm codant pour un récepteur membranaire présent dans une cellule de mammifère, ledit fragment d'ARNm édité ayant la séquence notée «E» et ledit fragment d'ARNm non édité ayant la séquence notée «NE», caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

A) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules exprimant le gène dudit ARNm susceptible d'être édité ;

20 B) la mise en évidence de la modulation ou non de l'édition du site d'édition dudit ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape A) par un procédé selon la revendication 17 et dans lequel procédé au moins deux desdites sondes sont deux ADN correspondant, pour l'un à la séquence d'ADN dudit fragment «E» et, pour l'autre, à la séquence d'ADN dudit fragment «NE» ;

25 C) le cas échéant, en ce que l'on compare à l'étape c) du procédé selon la revendication 17 la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés au niveau de chacune desdites sondes à celles obtenues à partir d'une population de cellules témoins ; et

30 D) la sélection de ce composé si celui module l'édition dudit site d'édition.

26/ Méthode de sélection de composés capables de moduler le taux d'édition d'un fragment d'ARNm codant pour un récepteur membranaire présent dans une cellule de mammifère, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

35 A) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules exprimant le gène dudit ARNm susceptible d'être édité ;

30/ Biopuce selon la revendication 29, caractérisée en ce que ledit support solide est choisi parmi les supports solides en verre, en plastique, en Nylon®, en silicium, en silicium ou en polyoses.

31/ Biopuce selon la revendication 29 ou 30, caractérisée en ce que lesdites sondes sont fixées sur ledit support solide, de préférence par liaison covalente.

32/ Réacteur comprenant en solution un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 28.

33/ Dispositif, notamment une plaque ou une microplaque, constitué d'au moins deux conteneurs, de préférence deux cupules, ledit dispositif comprenant un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 28, chacun des conteneurs contenant une desdites sondes.

34/ Trousse de réactifs pour la détection, l'analyse qualitative ou quantitative d'acides nucléiques cibles dans un échantillon, caractérisée en ce qu'elle comprend un jeu d'au moins deux sondes différentes selon l'une des revendications 13 à 28, une 15 biopuce selon l'une des revendications 29 à 31, ou un dispositif selon la revendication 33.

35/ Procédé pour la détection et/ou la quantification d'oligonucléotides cibles dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

20 a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence sur une biopuce selon l'une des revendications 29 à 31, ou dans chacun des conteneurs du dispositif selon la revendication 33, dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes ;

25 b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par hybridation spécifique au niveau de chacune desdites sondes.

36/ Procédé pour la détection et/ou la quantification d'oligonucléotides cibles
30 dans un échantillon, ledit oligonucléotide cible étant dérivé d'un fragment d'ARNm
susceptible de comporter au moins un site d'édition dans la séquence du fragment
dont dérive ledit oligonucléotide cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes
suivantes :

a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence,

B) la mise en évidence de la modulation ou non du taux d'édition dudit fragment d'ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape A) par un procédé selon la revendication 17 ;

5 C) la détermination à la fin de l'étape c) du procédé selon la revendication 17 et pour chacune desdites sondes du taux d'édition correspondant au rapport exprimé en pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes ;

10 D) le cas échéant, en ce que l'on compare le taux d'édition obtenu à celui obtenu pour une population de cellules témoins ; et

15 E) la sélection de ce composé si celui module le taux d'édition dudit fragment d'ARNm.

27/ Méthode de sélection de composés capables de moduler le taux d'édition d'un fragment d'ARNm selon la revendication 26, ledit ARNm codant pour le récepteur membranaire 5-HT_{2C}-R, caractérisée en ce que ledit fragment d'ARNm comprend la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R et en ce qu'à l'étape B dudit procédé, la mise en évidence de la modulation ou non du taux d'édition dudit fragment d'ARNm est réalisée par un procédé selon la revendication 18 dans lequel à l'étape a) ladite biopuce ou les conteneurs dudit dispositif comprennent 20 un jeu de sondes selon la revendication 10 ;

C) la détermination à la fin de l'étape c) du procédé selon la revendication 18 et pour chacune desdites sondes du taux d'édition correspondant au rapport exprimé en pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes ;

25 D) le cas échéant, en ce que l'on compare le taux d'édition obtenu à celui obtenu pour une population de cellules témoin ; et

E) la sélection de ce composé si celui-ci module le taux d'édition dudit fragment d'ARNm.

28/ Méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'à l'étape E), on sélectionne le composé si celui-ci diminue le taux d'édition d'un site d'édition dudit fragment d'ARN, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés du 5-HT_{2C}-R provenant de la traduction de l'ARNm non édité.

- soit sur une biopuce revêtue d'un jeu de sondes selon la revendication 23, ou
- soit dans chacune des cupules d'une microplaque, constitué d'au moins deux cupules, ladite microplaque comprenant un jeu de sondes selon la revendication 23, chacune des cupules contenant une seule desdites sondes,

5 dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes ;

b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

10 c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par hybridation spécifique au niveau de chacune desdites sondes.

37/ Procédé pour la détection et/ou la quantification de tout oligonucléotide cible dérivé d'un fragment d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition dans la séquence du fragment dont dérive ledit oligonucléotide cible, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

15 a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence,

- soit sur une biopuce revêtue d'un jeu de sondes selon la revendication 26, ou
- soit dans chacune des cupules d'une microplaque, constitué d'au moins deux cupules, ladite microplaque comprenant un jeu de sondes selon la revendication 26, chacune des cupules contenant une seule desdites sondes,

20 dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes ;

b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et

25 c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par hybridation spécifique au niveau de chacune desdites sondes.

38/ Procédé pour la détection et/ou la quantification de tout oligonucléotide cible présent dans un échantillon et dérivé d'un fragment comprenant la séquence 30 5-SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm édité ou non édité, du 5-HT_{2C}-R, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) le dépôt de l'échantillon contenant lesdits oligonucléotides cibles dont on cherche à détecter la présence,

35 - soit sur une biopuce revêtue d'un jeu de sondes selon la revendication 27 ou 28, ou

29/ Méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'à l'étape E), on sélectionne le composé si celui-ci augmente le taux d'édition d'un site d'édition dudit fragment d'ARN, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés du 5-HT_{2C}-R provenant de la traduction de l'ARNm non édité.

5

- soit dans chacune des cupules d'une microplaqué, constitué d'au moins deux cupules, ladite microplaqué comprenant un jeu de sondes selon la revendication 27 ou 28, chacune des cupules contenant une seule desdites sondes,
- 5 dans les conditions permettant l'hybridation spécifique desdits oligonucléotides cibles avec lesdites sondes ;
- b) le cas échéant, le rinçage de la biopuce obtenue à l'étape a) dans les conditions permettant l'élimination des acides nucléiques de l'échantillon non capturés par hybridation ; et
- 10 c) la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés par hybridation spécifique au niveau de chacune desdites sondes.
- 15 39/ Procédé de détermination du pourcentage, dans un même échantillon, de chacune des formes, éditées et non éditées, d'ARNm susceptible de comporter au moins un site d'édition, par rapport à la quantité totale des formes d'ARNm éditées ou non éditées présentes dans ledit même échantillon (dénommé «taux d'édition»), caractérisé en ce qu'il comprend un procédé selon la revendication 37 ou 38 dans lequel à la fin de l'étape c) on détermine pour chacune desdites sondes le rapport exprimé en pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes.
- 20 40/ Procédé selon l'une des revendications 37 à 39, caractérisé en ce que les oligonucléotides cibles sont des ARNm antisens ou des ADN complémentaires des fragments dudit ARNm édité et non édité, et en ce que lesdites sondes sont des ADN correspondant aux séquences du fragment dudit ARNm édité et non édité.
- 25 41/ Procédé selon l'une des revendications 35 à 39, caractérisé en ce que lesdits fragments dont dérivent les oligonucléotides cibles sont des fragments d'acides nucléiques extraits à partir d'un prélèvement biologique d'un organisme eucaryote, notamment le mammifère dont l'être humain.
- 30 42/ Procédé selon l'une des revendications 35 à 39, caractérisé en ce que les oligonucléotides cibles sont préalablement marqués par un marqueur capable d'engendrer directement ou indirectement un signal détectable, de préférence fluorescent ou radioactif.
- 35 43/ Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 29 à 31, ou d'un dispositif selon la revendication 33, comme matrice d'affinité, pour la purification d'acides nucléiques ou pour le séquençage d'acides nucléiques.
- 44/ Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 29 à 31, ou d'un dispositif selon la revendication 33, pour la détection et/ou l'étude de polymorphismes

génétiques, notamment de SNP ("single nucleotide polymorphism") ou pour l'analyse qualitative ou quantitative de l'expression de gènes.

45/ Utilisation d'une biopuce selon l'une des revendications 29 à 31, ou d'un dispositif selon la revendication 33, pour la détermination du taux d'édition d'un ARNm.

5 46/ Méthode de sélection d'un composé capable de moduler l'édition d'un site d'édition situé sur un fragment d'un ARNm présent dans une cellule eucaryote, notamment de mammifère, ledit fragment d'ARNm édité ayant la séquence notée «E» et ledit fragment d'ARNm non édité ayant la séquence notée «NE», caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

10 a) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules eucaryotes exprimant le gène dudit ARNm susceptible d'être édité ;

15 b) la mise en évidence de la modulation ou non de l'édition du site d'édition dudit ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape a) par un procédé selon la revendication 36 et dans lequel procédé au moins deux desdites sondes sont deux ADN correspondant, pour l'un à la séquence d'ADN dudit fragment «E» et, pour l'autre, à la séquence d'ADN dudit fragment «NE» ;

20 c) le cas échéant, en ce que l'on compare à l'étape c) du procédé selon la revendication 36 la détection et/ou la quantification des oligonucléotides cibles capturés au niveau de chacune desdites sondes à celles obtenues à partir d'une population de cellules témoin ; et

d) la sélection de ce composé si celui module l'édition dudit site d'édition.

25 47/ Méthode de sélection de composés capables de moduler le taux d'édition d'un fragment d'ARNm présent dans une cellule eucaryote, notamment de mammifère, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

30 a) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules eucaryotes exprimant le gène dudit ARNm susceptible d'être édité ;

b) la mise en évidence de la modulation ou non du taux d'édition dudit fragment d'ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape a) par un procédé selon la revendication 37 ;

c) la détermination à la fin de l'étape c) du procédé selon la revendication 37 et pour chacune desdites sondes du taux d'édition correspondant au rapport exprimé en

pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes ;

d) le cas échéant, en ce que l'on compare le taux d'édition obtenu à celui obtenu pour une population de cellules témoin ; et

5 e) la sélection de ce composé si celui module le taux d'édition dudit fragment d'ARNm.

48/ Méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du fragment comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R dans une cellule eucaryote, notamment de mammifère, 10 caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

a) la mise en contact dudit composé à évaluer avec une population de cellules eucaryotes exprimant le gène dudit ARNm ;
b) la mise en évidence de la modulation ou non du taux d'édition dudit fragment d'ARNm dans ladite cellule à partir d'un échantillon d'oligonucléotides cibles dérivés 15 dudit fragment d'ARNm et obtenus à partir d'un extrait d'acides nucléiques issu desdites cellules obtenues à l'étape a) par un procédé selon la revendication 38 ;

c) la détermination à la fin de l'étape c) du procédé selon la revendication 38 et pour chacune desdites sondes du taux d'édition correspondant au rapport exprimé en pourcentage entre la quantité d'oligonucléotides capturés par une sonde et la quantité 20 totale d'oligonucléotides capturés par l'ensemble des sondes ;

d) le cas échéant, en ce que l'on compare le taux d'édition obtenu à celui obtenu pour une population de cellules témoin ; et

e) la sélection de ce composé si celui-ci module le taux d'édition dudit fragment d'ARNm.

25 49/ Méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R selon la revendication 48, caractérisée en ce qu'à l'étape e), on sélectionne le composé si celui-ci diminue le taux d'édition d'un site d'édition dudit fragment d'ARN, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des 30 acides aminés du 5-HT_{2C}-R provenant de la traduction de l'ARNm non édité.

50/ Méthode de sélection d'un composé capable de moduler le taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R selon la revendication 48, caractérisée en ce qu'à l'étape e), on sélectionne le composé si celui-ci augmente le taux d'édition d'un site d'édition

dudit fragment d'ARN, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés du 5-HT_{2C}-R provenant de la traduction de l'ARNm non édité.

5 51/ Utilisation d'un composé capable de moduler le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit composé étant susceptible d'être sélectionné par un procédé selon la revendication 48, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à moduler l'humeur chez un patient nécessitant un tel traitement.

10 52/ Utilisation d'un composé capable de moduler le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit composé étant susceptible d'être sélectionné selon la revendication 48 ou 49, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la dépression.

15 53/ Utilisation d'un composé capable de moduler le taux d'édition de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, ledit composé ayant été sélectionné par un procédé selon la revendication 48 ou 50, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la manie.

54. Composé ayant une activité modulatrice du taux d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R pour le traitement de l'humeur.

20 55. Composé capable de diminuer le taux d'édition d'un site d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés du 5-HT_{2C}-R provenant de la traduction de l'ARNm non édité, pour le traitement de la dépression.

25 56. Composé capable d'augmenter le taux d'édition d'un site d'édition du fragment d'ARN comprenant la séquence SEQ ID No. 33 (5'-AUA CGU AAU CCU A-3') de l'ARNm du 5-HT_{2C}-R, site d'édition qui lorsqu'il est édité modifie la séquence des acides aminés du 5-HT_{2C}-R provenant de la traduction de l'ARNm non édité, pour le traitement de la manie ou certaines formes de schizophrénie.

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOCORTech

<120> Nouvelle méthode d'analyse d'acide nucléique et son utilisation pour évaluer le degré d'édition de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2c}

<130> D20534

<140>

<141>

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c} humain

<400> 1

caatacgtaa tcctatt

17

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c} humain

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> n= i

<400> 2

cantacgtaa tcctatt

17

<210> 3

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c} humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> n= i

<400> 3

caatncgtaa tcctatt

17

<210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> n= i

<400> 4
 caatacgtan tcctatt

17

<210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (15)
 <223> n= i

<400> 5
 caatacgtaa tcctntt

17

<210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9)

<223> n= i

<400> 6

caatacgtta tcctatt

17

<210> 7

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> n= i

<220>

<221> modified_base

<222> (5)

<223> n= i

<400> 7

cantncgtaa tcctatt

17

<210> 8

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> n= i

<220>

<221> modified_base

<222> (10)

<223> n= i

<400> 8

cantacgtan tcctatt

17

<210> 9

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN

dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 9
cantacgtaa tcctntt

17

<210> 10
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<400> 10
cantacgtta tcctatt

17

<210> 11
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<400> 11
caatncgtan tcctatt

17

<210> 12
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 12
caatncgtaa tcctntt

17

<210> 13
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<400> 13
caatncgtta tcctatt

17

<210> 14
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}

humain

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 14
caatacgtan tcctntt

17

<210> 15
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<400> 15
caatacgtnn tccttatt

17

<210> 16
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 16

caataacgtta tcctntt

17

<210> 17
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<400> 17
cantncgtan tcctatt

17

<210> 18
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 18
cantncgtaa tcctntt

17

<210> 19
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> n= i

<400> 19
 cantncgtna tcctatt

17

<210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (15)
 <223> n= i

<400> 20
 cantacgtan tcctntt

17

<210> 21
 <211> 17
 <212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>

<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>

<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>

<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<400> 21

cantacgttn tcctatt

17

<210> 22

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>

<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>

<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>

<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 22

cantacgtna tcctntt

17

<210> 23

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 23
caatncgtan tcctntt

17

<210> 24
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220> .
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<400> 24
caatncgtnn tcctatt

17

<210> 25
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 25
caatncgtta tcctntt

17

<210> 26
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 26
caatacgttt tcctntt

17

<210> 27
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
humain

<220>
<221> modified_base

```

<222> (3)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 27
cantncgtan tcctntt
17

<210> 28
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
      dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT2c
      humain

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<400> 28
cantncgtnn tcctatt
17

<210> 29
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

```

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (15)
 <223> n= i

<400> 29
 cantncgtta tcctntt

17

<210> 30
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ADN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (9)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (15)
 <223> n= i

<400> 30
 cantacgttt tcctntt

17

```
<210> 31
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
      dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT2c
      humain

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 31
caatncgtnn tcctntt
```

17

```
<210> 32
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: ADN
      dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT2c
      humain

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i
```

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (15)
 <223> n= i

<400> 32
 cantncgttn tccctntt

17

<210> 33
 <211> 13
 <212> ARN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ARN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<400> 33
 auacguaua cua

13

<210> 34
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ARN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<400> 34
 caauacguaa uccuauu

17

<210> 35
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: ARN
 dérivé de l'ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{2c}
 humain

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)
 <223> n= i

<220>
 <221> modified_base
 <222> (5)

<223> n= i
<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> n= i

<220>
<221> modified_base
<222> (15)
<223> n= i

<400> 35
canuncunn uccunuu



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1/1

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601



Vos références pour ce dossier (facultatif)	239992 D20534 MIP
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0209524
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
NOUVELLE METHODE D'ANALYSE D'ACIDE NUCLEIQUE ET SON UTILISATION POUR EVALUER LE DEGRE D'EDITION DE L'ARNm DU RECEPTEUR 5-HT2c.	

LE(S) DEMANDEUR(S) :

BIOCORTECH
28, rue du Docteur Roux
75015 PARIS
FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom	MADIAR Jean-Jacques	
Prénoms		
Adresse	Rue	10, rue de Bellecordière
	Code postal et ville	69002 LYON FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	_____
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	_____
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

92-1284

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.